
Hydrogele als Drug Delivery Systeme basierend auf Hydroxyethylstärke

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Steffen Harling
aus Holzminden

1. Referent:

Prof. Dr. Henning Menzel

2. Referentin:

Prof. Dr. Heike Bunjes

eingereicht am:

26.10.2009

mündliche Prüfung (Disputation) am:

18.02.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Harling, S.; Schwoerer, A.; Scheibe, K.; Daniels, R.; Menzel, H. A new hydrogel drug delivery system based on Hydroxyethylstarch derivatives. J. Microencapsulation, accepted.

Heim, E., Harling, S., Ludwig, F., Menzel, H., and Schilling, M. Fluxgate magnetorelaxometry for characterization of hydrogel polymerization kinetics and physical entrapment capacity. J. Phys.: Condens. Matter 20: 204106-1 – 5 (2008).

Heim, E., Harling, S., Pöhlig, K., Ludwig, F., Menzel, H., Schilling, M. Fluxgate magnetorelaxometry of superparamagnetic nanoparticles for hydrogel characterization. J. Magn. Magn. Mater. 311: 150-154 (2007).

Tagungsbeiträge

Harling S., Schwoerer A., Heim E., Ludwig F., Schilling M., Menzel H.: Characterisation of Hydrogel Drug Delivery Systems by Fluxgate Magnetorelaxometry. (Poster) 8th World Biomaterials Congress Amsterdam, Amsterdam (NL) (2008).

Harling S., Heim E., Schwoerer A., Ludwig F., Schilling M., Menzel H.: Hydrogel characterisation: swelling vs. fluxgate magnetorelaxometry, (Poster) 10th European Symposium on Controlled Drug Delivery, Noordwijk (NL) (2008); Abstract veröffentlicht unter: J. Control. Rel. 132: I3 e68-e69 (2008).

Schwoerer A., Harling S., Menzel H., Daniels R.: Release behaviour of hydrogel microparticles based on hydroxy-ethyl-starch as a drug delivery system for proteins, 10th European Symposium on Controlled Drug Delivery, Noordwijk (NL) (2008); Abstract veröffentlicht unter: J. Control. Rel. 132: I3 e16-e17 (2008).

Harling S., Heim E., Ludwig F., Schilling M., Menzel H.: Hydrogel characterisation with fluxgate magnetorelaxometry, (Poster) Makromolekulares Kolloquium Freiburg, Freiburg (2008).

Harling S., Heim E., Ludwig F., Schilling M., Menzel H.: Hydrogel Characterization with Fluxgate Magnetorelaxometry, (Poster) 20th European Conference on Biomaterials, Nantes (F) (2006).

Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die mich im Verlauf meiner Promotion unterstützt haben:

Für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit zur Teilnahme an interessanten Tagungen und die intensive Betreuung bedanke ich mich bei meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Henning Menzel. Frau Prof. Dr. Heike Bunjes danke ich für die Übernahme des Koreferats und für die interessanten Diskussionen im Rahmen unserer Kooperation im Teilprojekt D1 des Sonderforschungsbereichs 578 „Vom Gen zum Produkt“. Über diese Kooperation wurde ich durch interessante Denkanstöße auch von Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels unterstützt, dem ich, wie auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung danken möchte.

Ohne meine lieben Kollegen wäre so manches schwieriger gewesen, daher mein Dank dem gesamten Arbeitskreis Menzel mit seinen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern für die gute Zusammenarbeit, für die zahlreichen Diskussionen und für den Spaß neben der Arbeit. Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Nina Adden für die Unterstützung zum Anfang der Hydrogellarbeiten bedanken. Frau Dr. Simone Jurjevic danke ich für die Einführung und die Tipps zur GPC. Herrn Dr. Olaf Helmecke möchte ich für sein stets offenes Ohr und die anregenden Diskussionen danken. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Sven Pohle für die Unterstützung bei längeren Waage-Sessions und sein stets offenes Ohr für Probleme aus allen Labor- und Lebenslagen. Herrn Dipl.-Chem. Uwe Mundil möchte ich für seinen Support in Computerfragen und das angenehme Arbeitsklima danken. Herrn Dipl.-Chem. Ansgar Niehoff und Herrn Dipl.-Chem. Christian Bork möchte ich ebenfalls für seine Unterstützung in Computerfragen danken. Meinen Bürokollegen Herrn M. Sc. El Badawy Kamoun und Frau Dipl.-Chem. Corinna Lorenz möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre und ihre Toleranz gegenüber meinem Musikgeschmack danken. Frau M. Sc. Corinna Pfaffenroth und Frau M. Sc. Aromita Sen danke ich für den herzlichen Umgang und das Anstecken mit dem „Stempelfieber“. Den neuen Mitgliedern des Arbeitskreises, Frau Dipl.-Chem. Maria Stern, Frau Dipl.-Chem. Magda Slusznjak, Frau Dipl.-Chem. Bianca Tiedemann, Herrn M. Sc. Sajjad Warraich und Frau Dr. Wibke Dempwolf möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre in meinen letzten Wochen am Institut danken. Ein besonderer Dank gilt meinem lieben „Kollega“ Herrn Dipl.-Ing. Salvador Navarro Navarro für das gegenseitige Motivieren während des Zusammenschreibens und das angenehme Arbeiten in unserem Exil. Meinem Nachfolger, Herrn Dipl.-Chem. Andreas Beertz danke ich für seine anregenden Diskussionen

zu Hydrogelen und seine Unterstützung in Computerfragen und wünsche ihm viel Erfolg bei den weiteren Forschungsarbeiten zu Hydrogelen auf Basis von Hydroxyethylstärke.

Neben den Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich auch den übrigen Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie danken. Frau Christa Vogel und Frau Gabi Schirmer für die Navigation durch die Welt der Verwaltung, Frau Anita Schirmer für REM-Untersuchungen und ihre Unterstützung an der GPC, Frau Birgit Niehoegen für die Hilfe bei kleinen und großen Problemen im Labor, Herrn Dr. Dirk-Christian Eiting als Büronachbar für seine mentale Unterstützung und ganz besonders Herrn Rolf Harrendorf für die Lösung nahezu aller technischer Probleme und die angenehme Zeit an der Werkbank.

Für die Durchsicht des Manuskripts danke ich Frau Dr. Nina Adden, Frau Dr. Wibke Dempwolf und Frau LM-Chem. Antje Vollmer.

Sehr dankbar bin ich meinen Eltern, meinen Geschwistern und auch Antjes Eltern, die mich auch schon während des Studiums stets unterstützt und an mich geglaubt haben.

Vor allem möchte ich aber meiner Verlobten Antje für ihre Geduld mit mir, ihre fachliche und seelische Unterstützung danken, ohne die mir so manches sehr viel schwerer gefallen wäre. Danke für alles.

I. Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	8
1.1	Aufgabenstellung	11
2.	Theorie	13
2.1	Hydrogele	13
2.1.1	Hydrogele in Drug Delivery Systemen	21
2.2	Hydroxyethylstärke und ihre Derivate	24
2.3	Charakterisierung von Hydrogelen	32
2.3.1	Quellungsmessungen	32
2.3.2	Rheologiemessungen	37
2.3.3	Magnetrelaxometrie (MRX)	44
3.	HESHEMA	50
3.1	Synthese	50
3.2	Charakterisierung von HESHEMA	51
3.2.1	Bestimmung des Substitutionsgrades (DS)	51
3.2.2	Einflussgrößen auf HESHEMA: Verhältnis der Edukte	53
3.2.3	Einflussgrößen auf HESHEMA: DMAP Konzentration	60
3.2.4	Reaktionsvorschlag	71
3.2.5	Abbauverhalten von HESHEMA	74
3.3	Hydrogele aus HESHEMA	79
3.3.1	Quellungsmessungen an HESHEMA-Hydrogelen	81
3.3.2	Rheologiemessungen an HESHEMA-Hydrogelen	85
3.3.3	Magnetrelaxometrie-Untersuchungen an HESHEMA-Hydrogelen ^{22, 137}	92
3.3.4	Abbaubarkeit von HESHEMA-Hydrogelen	99
3.3.5	Freisetzung aus HESHEMA-Hydrogelen	100
3.4	Fazit zu HESHEMA	103
4.	Weitere vernetzbare HES-Derivate	105
4.1	HESPEGMA	105
4.1.1	Synthese von HESPEGMA	106
4.1.2	Charakterisierung von HESPEGMA	107
4.1.3	Hydrogele aus HESPEGMA	110
4.1.4	Fazit zu HESPEGMA	114
4.2	HESMA	115
4.2.1	Synthese von HESMA	116
4.2.2	Charakterisierung von HESMA	117
4.2.3	Hydrogele aus HESMA	127
4.2.4	Fazit zu HESMA	135
5.	Vergleich der unterschiedlichen HES-Derivate	138
6.	Zusammenfassung und Ausblick	146
7.	Experimenteller Teil	148
7.1	Verwendete Chemikalien	148
7.1.1	Lösungsmittel	148
7.1.2	Chemikalien	148
7.2	Hydroxyethylmethacrylatimidazol (HEMACI)	149
7.3	Hydroxyethylstärkehydroxyethylmethacrylat (HESHEMA)	150
7.4	Polyethylenglycolmethacrylatimidazol (PEGMACI)	151
7.5	Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat (HESPEGMA)	152
7.6	Hydroxyethylstärkemethacrylat (HESMA)	153
7.7	Verwendete Geräte und Methoden	154
7.7.1	NMR-Spektroskopie	154

7.7.2	UV-Belichtung	154
7.7.3	Gelpermeationschromatographie	155
7.7.4	Hydrogeluntersuchungen	155
7.7.5	Enzymatischer Abbau	157
8.	Literatur	159

II. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

α	Dehnungsrate
AGU	Anhydroglucoseeinheit
ATPS	Aqueous Two Phase System = wässriges Zweiphasensystem
β	Größenverteilungsfaktor
B_{fluxgate}	differentielles MRX-System
B_{gebunden}	Maß für die immobilisierten MNPs
BMP-2	bone morphogenetic proteine
B_{off}	Offset
$B_{\text{ungebunden}}$	Maß für die mobilen MNPs
γ	Verformung
γ_0	Deformationsamplitude
$\dot{\gamma}$	Geschwindigkeitsgefälle der Deformation
C_n	Flory charakteristische Verhältnis
C2/C6	Verhältnis der Substitution in C-2- zu C-6-Position
CDI	1, 1'-Carbonyldiimidazol
CLSM	Confokale Laser Scanning Mikroskopie
$^{13}\text{C-NMR}$	Kohlenstoff-Kernresonanzspektroskopie
δ	Phasenverschiebung, Phasenwinkel
dex-HEMA	Dextran-Hydroxyethylmethacrylat
dex-lactat-HEMA	HEMA-Oligolactatderivatisiertem Dextran
dexMA	Dextran-Methacrylat
DDS	Drug Delivery System
ΔG_{el}	freie Elastizitätsenergie
ΔG_{mix}	freie Mischungsenergie
ΔG_{total}	freie Gibbsenergie
$\Delta\mu$	chemisches Potential
ΔM_{ru}	Fehler aus der DS-Bestimmung
$\overline{\Delta M_w}$	Fehler aus dem Lichtstreuungssignal
ΔX_w	Fehler des Polymerisationsgrades
DMAP	Dimethylaminopyridin

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dn/dc	Brechungsindexinkrement
D ₂ O	Deuteriumoxid
DS	Degree of Substitution = Substitutionsgrad
EDC	<i>N,N</i> (3-dimethylaminopropyl) <i>N</i> -ethylcarbodiimid
η	Viskosität der die MNPs umgebende Flüssigkeit
f	Schwingungsfrequenz
f	Rückstellkraft des Elastomers gegenüber einer Zugkraft
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
G	Elastizitätsmodul
G^*	komplexer Schubmodul
G'	Elastizitätsmodul, Speichermodul
G''	Viskositätsmodul, Verlustmodul
GDOL	Glycidol
GMA	Glycidylmethacrylat
GPC	Gelpermeationschromatographie
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HEMA-CI	Hydroxyethylmethacrylatcarbonylimidazol
HES	Hydroxyethylstärke
HESHEMA	Hydroxyethylstärkehydroxyethylmethacrylat
HESMA	Hydroxyethylstärkemethacrylat
HESPEGMA	Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat
HESPEG10MA	Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat mit 10 Ethylenoxideinheiten
HESPEG6MA	Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat mit 6 Ethylenoxideinheiten
HH-WW	Wasserstoff-Wasserstoff Wechselwirkung
H_{mag}	externes magnetisches Feld während der Aufmagnetisierungsdauer
$^1\text{H-NMR}$	Protonen-Kernresonanzspektroskopie
I_a	Intensität des $^1\text{H-NMR}$ -Signals des Vinylprotons
I_{H^1}	Intensität des $^1\text{H-NMR}$ -Signals der H^1 -Protonen der AGU

IR	Infrarotspektroskopie
k	Boltzmann Konstante
K	effektive Anisotropiekonstante
k_B	Boltzmann Konstante
KBr	Kaliumbromid
Kryo-SEM	Kryorasterelektronenmikroskopie
l	Länge einer Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung
L	Länge der Ausdehnung
LS	Lichtstreuendetektor
M_{AGU}	Molekulargewichts der Wiederholungseinheit der HES
$\overline{M_c}$	mittleres Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten
M_H	Molekulargewicht eines Protons
M_{HEMACI}	Molekulargewicht des HEMACI-Substituenten
$\overline{M_n}$	zahlenmittleres Molekulargewicht
MNP	magnetisches Nanopartikel
m_{Probe}	Nettomagnetisierung der MNPs
M_r	Molekulargewicht der Wiederholungseinheit
M_{ru}	Molekulargewicht der Wiederholungseinheit
MRX	Magnetrelaxometrie
MS	mitolarer Substitutionsgrad
MS	Massenspektroskopie
$\overline{M_w}$	Gewichtsmittel
n	Anzahl der Netzwerkketten pro Volumeneinheit
n	Anzahl der Ethylenglycolwiederholungseinheiten
NMR	Kernresonanzspektroskopie
P1	Peak 1 mit kürzestem Elutionsvolumen
P2	Peak 2 mit mittlerem Elutionsvolumen
P3	Peak 3 mit längstem Elutionsvolumen
PEG	Polyethylenglycol
PEGMA	Polyethylenglycolmethacrylat
PEGMA-CI	Polyethylenglycolmethacrylatcarbonylimidazol
PEG-Lsg.	Polyethylenglycollösung

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionen
PP	Polypropylen
PS-Lsg.	Polysaccharidlösung
q	massenbezogene Quellungsrate
Q	volumenbezogene Quellungsrate
ρ	Dichte des Polymers
ρ_1	Dichte des Quellmittels
ρ_2	Dichte des Polymers
r	Abstand der Polymerkettenenden
R	allgemeine Gaskonstante
$\left(\overline{r_o^2}\right)^{1/2}$	mittlere Quadratwurzel des Abstands der Netzwerkketten zwischen zwei benachbarten Vernetzungspunkten im ungequollenen Zustand
$\frac{\overline{r_0^2}}{\overline{r_f^2}}$	Frontfaktor
RI	Brechungsindexdetektor
ROH	Alkohol
$\Omega(r,T)$	Wahrscheinlichkeit, dass eine Polymerkette mit dem End-zu-end-Abstand r bei der Temperatur T eine bestimmte Konformation annimmt
RT	Raumtemperatur
S	Entropie
SEC-MALS	Größenausschlusschromatographie mit Mehrwinkel-Lichtstreuungsdetektor
t	Zeit
T	Temperatur
τ	Schubspannung
τ_B	Zeitkonstante (Brown)
τ_{eff}	effektive Zeitkonstante
$\tau_{gebunden}$	phänomenologische Zeitkonstante der immobilisierten MNPs
τ_N	Zeitkonstante (Néel)
$\tau_{ungebunden}$	phänomenologische Zeitkonstante der mobilen MNPs
$\tan \delta$	Verlustfaktor

THF	Tetrahydrofuran
t_{mag}	Aufmagnetisierungsdauer
$t_{\text{mess, FG}}$	Messdauer
U	innere Energie
UV	Ultraviolette Strahlung
\bar{v}	spezifisches Polymervolumen
V	Volumen
V_1	molares Volumen des Wassers
$v_{2,r}$	Volumenanteil des Polymers am Gesamtvolumen des Hydrogels nach dem Vernetzen vor dem Quellen
$v_{2,s}$	Volumenanteil des Polymers am Gesamtvolumen des Hydrogels im Gleichgewichtszustand
V_g	Gelvolumen
V_h	hydrodynamisches Volumen des MNPs
V_k	Kernvolumen
V_p	Polymervolumen
v/v	Volumenverhältnis
ω	Kreisfrequenz
WW	Wechselwirkung
W/W-Emulsion	Wasser in Wasser Emulsion
ξ	Netzwerkmaschenweite
χ_1	Polymer-Lösungsmittel-Wechselwirkungsparameter
X_w	Polymerisationsgrad, bestimmt aus dem Gewichtsmittel

1. Einleitung

Die Bedeutung von pharmazeutisch wirksamen Proteinen und Peptiden wird in der nahen Zukunft weiterhin stark zunehmen^{1, 2}. Der Umsatz von Biopharmazeutika ist allein in Deutschland im Jahre 2007 im Vergleich zum Vorjahr um 28 Prozent auf circa 4 Mrd. Euro gestiegen und umfasst jetzt 15 Prozent des Gesamtpharmamarktes³. Ein Viertel der neu zugelassenen Medikamente in Deutschland 2007 sind Biopharmazeutika³. Die Entwicklung von leistungsfähigen Verabreichungsformen für diese neuen Wirkstoffe ist somit wichtig, um das Potential dieser Therapeutika auszuschöpfen.

Die pharmazeutisch wirksamen Proteine und Peptide sind aufgrund ihrer Struktur sehr spezifisch auf ein bestimmtes Zielmolekül abgestimmt. Daher reagieren sie, im Idealfall, primär an dem zu behandelnden Organ, dem erkranktem Gewebetyp oder der Läsion⁴. Durch diese Fähigkeit erfolgt eine gezielte Behandlung des jeweiligen Krankheitsbildes ohne wesentliche Nebenwirkungen⁴. Der Wirkstoff wirkt nur an der zu behandelnden Stelle und wird nicht über den gesamten Körper verteilt. Die therapeutischen Proteine ähneln stark den körpereigenen Eiweißen, wodurch sich ihre Abbauraten leicht vorhersagen lassen, was eine gezielte Medikation erleichtert. Es kommt allerdings bei therapeutischen Proteinen häufiger zu Immunreaktionen als bei Medikamenten auf Basis kleiner Moleküle, da Fremdproteine für das Immunsystem ein mögliches Zeichen einer Infektion sind⁵. Dennoch überwiegen die Vorteile der Biopharmazeutika wie Sicherheit und Wirksamkeit bei der Entwicklung neuer Medikamente⁵. Ihre Erfolgswahrscheinlichkeit ist deutlich höher als bei klassischen Arzneien, mindestens 25 Prozent der Biopharmazeutika aus Phase I erreichen die Zulassung. Bei klassischen Wirkstoffen liegt diese Quote bei maximal 6 Prozent⁵. Diese Art der Medikamente sind daher gute Ergänzungen zu den bestehenden klassischen Medikamenten, die ihre Berechtigung im Markt haben. Denn nur bei deutlich höherem Nutzen und therapeutischem Wert haben Biopharmazeutika am Markt eine Chance gegenüber klassischen Medikamenten aus kleineren Molekülen, deren therapeutischer Nutzen und Verträglichkeit bei geringeren Kosten bewiesen sind⁴.

Um den Gebrauch der neuen Medikamente Biopharmazeutika zu unterstützen, müssen neue Formen der Applikation entwickelt werden. Generell bieten sich zwei Arten der Medikation an, peroral oder parenteral, d.h. unter Umgehung des Gastrointestinaltraktes. Die orale Verabreichung von therapeutischen Proteinen und Peptiden wird durch zwei wesentliche Faktoren behindert: den proteolytischen Abbau im Magen und ein unzulänglicher Absorptionsmechanismus für Polypeptide im Magen⁶. Daher werden die Therapeutika auf

Proteinbasis in der Regel parenteral über Injektionen verabreicht, was aufgrund der Schmerzen durch die Nadeln bei Patienten häufig auf geringe Zustimmung stößt⁶. Das pharmakokinetische Profil der therapeutischen Proteine und Peptide⁷ macht zur Aufrechterhaltung therapeutisch wirksamer Konzentrationen Mehrfachinjektionen oder eine Tropfgabe erforderlich.

Eine sehr elegante Methode, um diese Nachteile zu umgehen, ist das Einbringen eines Reservoirs in die Nähe des zu behandelnden Gewebes oder Organs, aus dem eine kontrollierte Freigabe des Wirkstoffs erfolgt. Dadurch lassen sich die Vorzüge der Injektion - Nähe zum Wirkort und kontrollierte Abgabe - mit denen der peroralen Verabreichung - einmalige Aufnahme und örtliche Ungebundenheit des Patienten - kombinieren. Als Verabreichungsformen sind Mikrokügelchen in Lösung zur Injektion oder größere Reservoirs, die im Rahmen einer Operation eingesetzt werden können, denkbar. Diese Verabreichungsformen sollten biokompatibel und bioabbaubar sein, den Wirkstoff nicht schädigen und ihn kontrolliert auch über längere Zeiträume freisetzen. Diese Anforderungen können sehr gut von Mikrosphären aus Hydrogelen⁸ erfüllt werden. Hydrogelbasierte Drug Delivery Systeme (DDS) sind deshalb sehr interessante und noch nicht erschöpfend erforschte Verabreichungsformen für die Applikation von pharmazeutisch aktiven Proteinen und Peptiden⁹.

Hydrogele sind dreidimensionale, hydrophile Polymernetzwerke, die in der Lage sind, große Mengen an Wasser oder biologischer Flüssigkeiten einzulagern⁸. Somit sind gute Umgebungsbedingungen für die Proteintherapeutika gegeben. Bei entsprechender Wahl der Herstellung lassen sich Stressfaktoren für die Proteine minimieren, wodurch eine entsprechend gute Freisetzung ermöglicht wird. Diese Stressfaktoren sind u.a. zu hohe und zu niedrige Temperaturen, Kontakt mit hydrophoben Oberflächen, Scherstress, hohe und niedrige pH-Werte, vollständige Trocknung und organische Lösungsmittel¹⁰. Um diese Denaturierungsgefahren zu umgehen und um Mikropartikel herzustellen, bietet sich der Einsatz eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems (aqueous two phase system, ATPS) an. Diese Systeme basieren auf einer Phasenseparation, die in wässrigen Systemen beobachtet werden kann, wenn mindestens zwei hydrophile Polymere gelöst sind¹¹. Dieses Verteilungsgleichgewicht lässt sich durch mehrere Parameter, wie z.B. Molekulargewicht, Molekülgeometrie oder die Affinität zum Lösungsmittel Wasser¹² beeinflussen. Bisher ist diese Technik nur für Systeme, die wässrige Lösungen von Dextran und Polyethylenglycol (PEG) beinhalten, gut untersucht¹³⁻¹⁸. Hinweise auf die Verwendung anderer Polymere für derartige wässrige Zwei-Phasen-Systeme sind spärlich, so dass eine Modifikation dieses

Systems mit einem ebenso gut verträglichen Polymer Chancen bietet, eine neue Applikationsform für pharmazeutisch wirksame Proteine und Peptide zu entwickeln. Ein gut verträgliches Polymer, dass auch ein wässriges Zwei-Phasen-System mit Polyethylenglycol ausbildet¹⁹, ist Hydroxyethylstärke (HES). Sie wird als Plasmaexpander eingesetzt²⁰ und erfüllt so die Anforderungen, die an ein Basismaterial für die Herstellung von Hydrogelen für den parenteralen Einsatz gestellt werden. Sie zeigt eine ähnlich gute Bioverträglichkeit und Bioabbaubarkeit wie das bisher verwendete Dextran²¹. Das Löslichkeitsverhalten dieser beiden Polysaccharide ist allerdings unterschiedlich. Aus Hydroxyethylstärke lassen sich durch Modifikation mit vernetzbaren Substituenten, analog zu den Arbeiten mit Dextran¹³, Derivate herstellen, die sich mittels UV-induzierter Polymerisation zu Hydrogelen vernetzen lassen²². Hydroxyethylstärke, die mit Hydroxyethylmethacrylat zu Hydroxyethylstärkehydroxyethylmethacrylat (HESHEMA) funktionalisiert wurde, und Polyethylenglycol zeigen in wässrigen Lösungen Phasenseparation, wodurch die Herstellung von Mikropartikeln über ein wässriges Zwei-Phasen-System möglich ist²³. Zur Herstellung der vernetzbaren HESHEMA-Derivate sind viele Einflussfaktoren zu untersuchen, da sich die Ergebnisse aus der Derivatisierung von Dextran nicht direkt übertragen lassen²⁴. Die Kenntnisse über diese neuen vernetzbaren Hydrogelbildner müssen ausgebaut werden und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Netzwerkeigenschaften untersucht werden. Neben dem HESHEMA-System bietet sich analog zur Modifizierung an Dextran¹³ auch die Variation der vernetzbaren Gruppe an, um unterschiedliche Hydrogele zu entwickeln. Die Art des Substituenten bietet Spielraum, um die Hydrogele den Anforderungen hinsichtlich des Abbaus und der Freisetzung¹⁸ anzupassen, die für die jeweiligen pharmazeutischen Proteine und Peptide vonnöten sind. Bei den HESHEMA-Derivaten erfolgt die Bindung an das Polymerrückgrat über eine Carbonatesterfunktion²²⁻²⁴. Die Variation zu einer normalen Esterbindung sollte in einem anderen Abbauverhalten des Hydrogels resultieren, wie es auch für Dextran basierte Hydrogele gegeben ist¹⁷. Auch die Art und Länge des Spacers²⁵, der zwischen der vernetzbaren Gruppe und dem Polymerrückgrat eingesetzt werden kann, bietet Ansatzpunkte, um Einfluss auf die Hydrogeleigenschaften zu nehmen. So sollte der Einbau von Ethylenoxideinheiten zwischen dem Rückgrat und der Vernetzungsfunktion zu einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit und einer Vergrößerung der Maschenweite des gebildeten Hydrogelnetzwerks führen.

Durch diese neuen vernetzbaren Derivate von Hydroxyethylstärke sollte eine umfangreiche Sammlung an unterschiedlichen, abbaubaren und biokompatiblen Hydrogelen entstehen, mit

der die Basis für die Entwicklung von modernen Drug Delivery Systemen für pharmazeutisch wirksame Proteine und Peptide gelegt ist.

1.1 Aufgabenstellung

Aus den ersten Arbeiten zu den Hydrogelen auf Basis von Hydroxyethylstärke^{23, 24} ergibt sich die Fragestellung, ob durch definierte Modifikation der Hydroxyethylstärke mit vernetzbaren Substituenten ein Drug Delivery System (DDS) ermöglicht wird, dessen Eigenschaften gezielt beeinflusst werden können. Es ergeben sich dabei drei Betrachtungsebenen. Die Variation der Polymere bildet die Basis, aus denen dann die Hydrogeleigenschaften als Zwischenebene hervorgehen und die dann in der dritten Ebene, dem DDS als Endziel übergehen.

Auf Polymerebene steht die Frage im Fokus, ob sich durch gezielte Variation der Edukte und der Reaktionsprodukte der Grad der Substitution mit vernetzbaren Gruppen entlang des Polymerrückgrates einstellen lässt.

Auf der Hydrogelebene soll durch genauere Charakterisierungsmethoden der Hydrogele (Quellung und Rheologie) der Zusammenhang zwischen der Variation des Substitutionsgrades des Polymers bzw. der Belichtungsdauer und den Hydrogeleigenschaften herausgearbeitet werden. Zusätzlich wird ein neues Verfahren zur Hydrogelcharakterisierung basierend auf der Magnetrelaxometrie (MRX) vorgestellt und mit den klassischen Methoden verglichen.

Auf der Ebene des DDS soll daraufhin der Einfluss der Hydrogeleigenschaften auf das Freisetzungs- und Abbauverhalten vorgestellt werden, was entscheidend für den Einsatz als DDS für die Freisetzung von therapeutischen Proteinen ist.

Durch vorangegangene Arbeiten von K. Scheibe²³ konnte gezeigt werden, dass sich mit Hydrogelen aus Hydroxyethylstärkehydroxyethylmethacrylat (HESHEMA) Proteine immobilisieren und wieder freisetzen lassen. Der Einfluss des Basismaterials HESHEMA ist noch nicht vollständig geklärt, da eine ausführliche Charakterisierung nicht erfolgt ist. Es zeigte sich allerdings, dass eine Variation der Substituentenverteilung der vernetzbaren Hydroxyethylmethacrylat-Funktionalitäten eine Variation der Hydrogeleigenschaften bewirkt²⁴. Damit die Einflussgrößen auf den Substitutionsgrad und somit die Anzahl der vernetzbaren Gruppen entlang des Polymerrückgrats sowie dessen Einfluss auf die Hydrogeleigenschaften bestimmt werden können, ist eine intensive Untersuchung der Synthesereaktion von HESHEMA erforderlich.

Dextranderivate mit anderen Substituenten als die HEMA-Gruppe zeigen ein abweichendes Abbauverhalten als die mit HEMA modifizierten Dextrane²⁵. Daher ist die Variation der vernetzbaren Hydroxyethylstärkederivate sinnvoll, um andere mögliche Hydrogelbasismaterialien zu entwickeln, die eine Variation des Abbau- und somit des Freisetzungsverhaltens ermöglichen. Das Augenmerk sollte auf der Variation des Spacers zwischen der Methacrylatgruppe und dem Polymerrückgrat liegen. Die Synthese von Methacrylat funktionalisierter Hydroxyethylstärke (HESMA) führt zu einem im Vergleich mit HESHEMA um eine Ethylenoxeinheit verkürztem Hydroxyethylstärkederivat. Die Verlängerung des Abstands zwischen der Methacrylatgruppe und dem Polymerrückgrat kann hingegen durch Einbringen von weiteren Ethylenoxeinheiten erfolgen. Somit sollte dann eine umfangreiche Sammlung an Hydroxyethylstärkederivaten geschaffen sein, welche die Entwicklung neuer Hydrogele ermöglichen.

2. Theorie

2.1 Hydrogele

Hydrogele sind hydrophile, dreidimensional verknüpfte Netzwerke, die große Mengen an Wasser bzw. wässrige Pufferlösungen aufnehmen können⁹. Durch die Vernetzung der Polymerketten sind die Hydrogele unlöslich in dem verwendeten Medium. Sie weisen allerdings eine thermodynamische Kompatibilität mit Wasser auf, wodurch eine Aufquellen durch Wasseraufnahme, einhergehend mit einem Volumenzuwachs, ermöglicht wird^{26, 27}.

Solch ein gequollenes Hydrogel aus einem Polymer, welches über Vernetzungsreagenzien vernetzt wurde, lässt sich nach folgender Abbildung (Abb. 1) klassisch illustrieren.

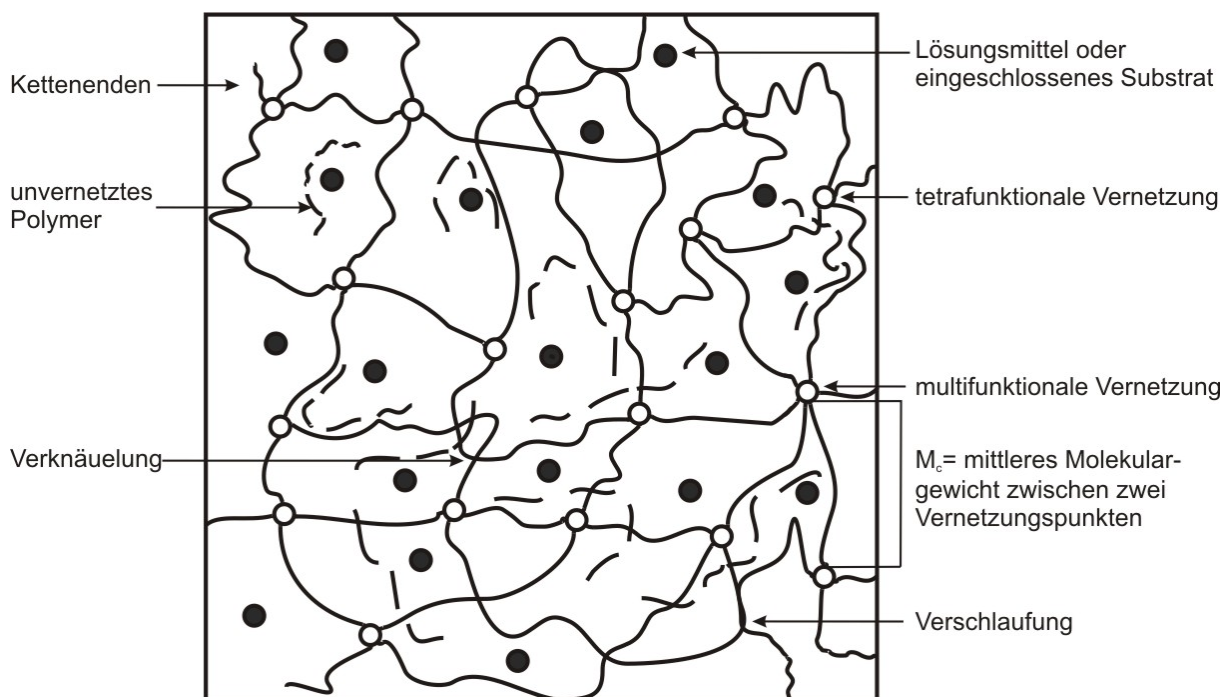


Abb. 1: Schematische Darstellung eines gequollenen Hydrogels nach Peppas⁸

Dabei treten tetrafunktionale Vernetzungen, multifunktionale Vernetzungen, Kettenenden, Verknäuelungen und Verschlaufungen auf. Zudem sind auch nicht vernetzte Polymerketten in dem Netzwerk vorhanden. Der Abstand zwischen zwei verbundenen Vernetzungspunkten wird als mittleres Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten, \overline{M}_c charakterisiert. Durch Quellen des Hydrogels wird die statistisch geknäuelte Anordnung der Kettensegmente zwischen zwei Vernetzungspunkten stärker gestreckt, die Maschenweite wird größer, und

eingeschlossenes Substrat oder Lösungsmittel kann durch Diffusion aus dem Netzwerk entweichen.

Ideale tetrafunktionale Vernetzungspunkte treten am häufigsten bei der Herstellung eines Hydrogels mit Hilfe eines difunktionalen Vernetzungsreagenzes auf. Multifunktionale Vernetzungen ergeben sich durch den Einsatz entsprechender Vernetzungsreagenzien. Die Vernetzungsreaktionen erfolgen aus entropischen Gründen nie bis zum 100%igen Umsatz, da durch die Vernetzung die Anzahl der Freiheitsgrade des Systems abnimmt. Somit verbleiben nichtvernetzte Polymerketten im Hydrogel, die jedoch durch Extraktion oder Auswaschen herausgelöst werden können. Neben diesen Einlagerungen kommt es auch zu Netzwerkdefekten wie Verknäuelungen und Verschlaufungen⁸.

Die Vernetzung in Hydrogelen sorgt für die mechanische Stabilität, während der hohe Solvensanteil zu fluidähnlichen Transporteigenschaften führt. Die besonderen physikalischen Eigenschaften, die aus diesem ungewöhnlichen Materialzustand resultieren, machen Hydrogele zu idealen Kandidaten für eine Vielzahl von Anwendungen. Den größten Nachteil, den Hydrogele allerdings aufweisen, ist ihre relativ geringe mechanische Belastbarkeit^{8, 28}. Diesem kann entgegengesteuert werden, indem die Vernetzungsdichte, die Anzahl von Vernetzungspunkten innerhalb eines Volumenelements, erhöht wird oder indem zu dem Hydrogel ein weiteres interpenetrierendes und stabileres Netzwerk hinzugegeben wird^{8, 28}. Eine weitere Variante ist die partielle Kristallisation, bei der die Kristallitbildung eine drastische Verstärkung der Struktur bewirkt⁸, oder die Zugabe von Schichtsilikaten²⁹ als Füllstoffe.

Es gibt verschiedene Anwendungsgebiete für Hydrogele wie den Einsatz als Ventile im Feinmechanikbereich^{30, 31}, in der Nahrungsmittelindustrie³² oder im medizinischen und pharmazeutischen Sektor⁸. Die Anwendung von Hydrogelen im pharmazeutischen Bereich soll im Weiteren näher betrachtet werden. Hydrogele ähneln dem menschlichen Gewebe mehr als alle anderen Klassen von künstlich hergestellten Biomaterialien⁹, da sie einen ähnlich hohen Wassergehalt und eine vergleichbare weiche Konsistenz aufweisen³³. Daher finden Hydrogele Anwendung als Kontaktlinsenmaterial³⁴, Membranen für Biosensoren³⁵, Trägermaterial zur Gewebe-^{36, 37} und Knochenneubildung³⁸, als Stentmaterial^{39, 40} und als Drug Delivery Systeme⁴¹⁻⁴⁵. Die Vielzahl der Anwendungen resultiert aus der großen Variation der Basismaterialien und der Herstellungsart von Hydrogelen, die im Folgenden über mehrere Möglichkeiten klassifiziert werden sollen (Abb. 2).

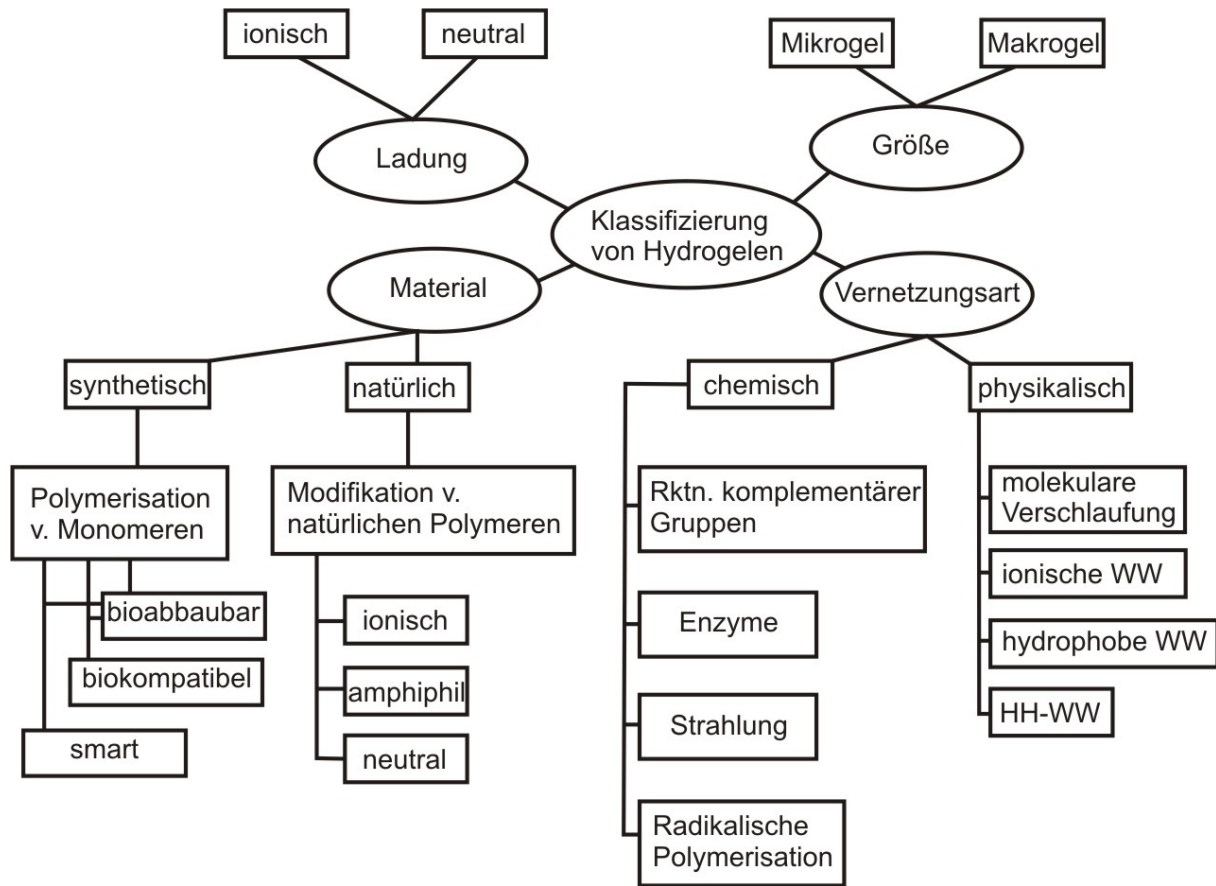


Abb. 2: Klassifizierung von Hydrogelen nach unterschiedlichen Gesichtspunkten (WW = Wechselwirkung)

Die Klassifizierung kann über vier verschiedene Eigenschaften der Hydrogele erfolgen. Zunächst kann nach Ladung klassifiziert werden in Hydrogele, die, je nach Natur der Seitengruppen im verwendeten Grundmaterial, neutral oder ionisch sind⁹. Eine weitere Einteilung ist die nach der Größe in Makrogele und Mikrogele. Makrogele sind Gele mit Größen im Mikrometerbereich oder darüber. Mikrogele⁴⁶⁻⁴⁸ sind kolloidale stabile Hydrogele mit einer Größe von einigen Nanometern bis zu mehreren Mikrometern. Hydrogele lassen sich zudem nach Material in synthetische und natürliche Hydrogele und Kombinationen dieser unterteilen⁴⁹. Synthetische Hydrogele haben den großen Vorteil, dass sie durch die Polymerisation von biokompatiblen Monomeren wie Hydroxyethylmethacrylat^{44, 50, 51}, *N*-Isopropylacrylamid⁵¹⁻⁵⁴ oder Vinylacetat^{55, 56} definiert herstellbar sind. Polymeranaloge Umsetzungen von synthetischen Polymeren werden allerdings auch häufig angewendet^{42, 57-59}. Zudem sind auch Copolymerisationen möglich, um verschiedene Eigenschaften wie z.B. pH- und Temperatursensitivität⁵¹ zu koppeln. Die natürlichen Hydrogele basieren auf natürlichen Polymeren, die, um vernetzbar zu werden, teilweise modifiziert wurden. Diese Polymere lassen sich gemäß ihrer Ladung unterteilen. Zu den anionischen Polymeren zur

Hydrogelherstellung zählen Hyaluronsäure, Dextransulfat, Pektin und Carrageenan^{49,60}. Bei den kationischen Polymeren zur Herstellung von Hydrogelen haben sich Chitosan^{37, 39, 61} und Polylysin⁶² etabliert. Aus der Gruppe der amphiphilen Polymere sind Collagen⁶³, Carboxymethylchitin⁶⁴ und Fibrin⁶⁵ als Hydrogele untersucht. Als neutrale natürliche Polymere haben sich Agarose⁶⁶, Pullulan⁶⁷ und Dextran^{48, 68-70} vielversprechend für den Einsatz als Matrixhydrogelmateriale erwiesen.

Die letzte Möglichkeit der Einteilung ist die nach der Vernetzungsart. Die Vernetzungen tragen wesentlich zu der Stabilität der Netzwerkstrukturen der Hydrogele bei und verhindern, dass sich die hydrophilen Ketten auflösen⁴¹. Sie können physikalisch reversibel oder als chemische, stabile Verknüpfung erfolgen⁴⁹.

Physikalisch verknüpfte Hydrogele beruhen auf nicht-kovalenten attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten. Unter diese Wechselwirkungen fallen molekulare Verschlaufungen und/oder Sekundärkräfte wie ionische⁷¹, hydrophobe⁷² oder Wasserstoff-Brückenbindungen^{49, 73}. Diese Gele sind nicht homogen, da die Vernetzung durch Cluster von molekularen Verschlaufungen oder Domänen von hydrophoben oder ionischen Wechselwirkungen erfolgt⁴⁹. Ein gutes Beispiel für ein physikalisch vernetztes Hydrogel sind Gele auf Basis von Alginat, einem Polysaccharid aus Mannuronsäure und Gluconsäure, welches durch Zugabe von Calciumionen vernetzt werden kann^{41, 74}. Durch ein chelatisierendes Agens, mit dem die Calciumionen herausgelöst werden, könnten die Vernetzungen wieder gelöst werden. Auch ein nichtionisches Polymer wie Dextran lässt sich physikalisch mit Kaliumionen vernetzen. Dabei passt der Ionenradius eines Kaliumions exakt in den Hohlraum, der von sechs Sauerstoffatomen gebildet wird, die sich in Glucose-Einheiten auf drei benachbarten Polymerketten befinden^{41, 75}. Nichtkovalente Vernetzungen können auch durch Mischungen und Durchdringungsnetzwerke⁵² zweier Polymere erreicht werden.

Da es bei der Herstellung von Hydrogelen aus Hydroxyethylstärkederivaten zur chemischen Vernetzung kommt, soll diese im Folgenden näher betrachtet werden. Die chemisch vernetzten Hydrogele sind in der Regel stabiler als die physikalisch vernetzten, da die Vernetzung über die Ausbildung von kovalenten Bindungen erfolgt⁴¹. Diese Bindungen können durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Reaktionen gebildet werden. Zum einen gibt es die Möglichkeit der Vernetzung durch chemische Reaktionen von komplementären Gruppen⁷⁴. Die wasserlöslichen Polymere verdanken ihre Löslichkeit dem Vorhandensein von funktionellen Gruppen wie Hydroxy-, Carbonsäure- oder Aminofunktionen⁷⁴. Durch Reaktionen von funktionellen Gruppen mit komplementärer Reaktivität lassen sich so

kovalente Bindungen zur Vernetzung ausbilden. Eine Variante ist das Vernetzen über Aldehydfunktionen. Wasserlösliche Polymere, die Hydroxyfunktionen tragen (z.B. Polyvinylalkohol), lassen sich mit Glutardialdehyd als Vernetzungsreagenz zu Hydrogelen umsetzen. Die Reaktionsbedingungen müssen sehr drastisch gewählt werden (geringer pH, hohe Temperatur, Methanolzugabe als Quencher), um Vernetzungen zu erhalten⁷⁶. Aminhaltige Polymere hingegen lassen sich mit demselben Reagenz bei milden Bedingungen unter Ausbildung eines Schiffchen-Basen-Paares vernetzen⁷⁷.

Andere Additionsreaktionen mit di-(oder höher)funktionellen Vernetzungsreagenzien, die mit den funktionellen Gruppen der wasserlöslichen Polymere reagieren, sind auch möglich. So lassen sich z.B. Polysaccharide mit 1,6-Hexamethyldiisocyanat⁷⁴, Divinylsulfon⁷⁸ oder 1,6-Hexandibromid⁷⁹ vernetzen. Diese Reaktionen müssen in organischen Lösungsmitteln erfolgen, da es in wässrigen Lösungen zu Nebenreaktionen mit Wasser kommt. Da die Vernetzungsreagenzien toxisch sind, muss eine intensive Extraktion der Gele erfolgen, um die toxischen Bestandteile zu entfernen. Eine Beladung mit Wirkstoffen für die pharmazeutische Anwendung ist somit erst nach der Gelbildung und der Extraktion möglich^{78, 79}, was eine einfache Nutzung als DDS erschwert. Die Vernetzung über die Reaktion von Dithiolen mit Acrylaten lässt sich allerdings auch bei Raumtemperatur unter physiologischen Bedingungen über die Reaktion von PEG-Dithiol mit PEG-Acrylaten durchführen⁸⁰. Durch die Funktionalität der PEG-Acrylate lassen sich dabei die Freisetzung von Wirkstoffen und der Abbau des Hydrogels beeinflussen.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Hydrogelen bieten Kondensationsreaktionen zwischen Hydroxy- oder Aminogruppen mit Carbonsäuren oder deren Derivaten⁷⁴. Ein sehr effizientes Reagenz für das Vernetzen von wasserlöslichen Polymeren über Amidbindungen ist *N,N*(3-dimethylaminopropyl)*N*-ethylcarbodiimid (EDC), welches die Vernetzung von Gelatin zu Hydrogelen ermöglicht⁸¹. Es lassen sich auch Hydroxygruppen von Cyclodextrinen mit Carbonyldiimidazol aktivieren, um dann mit PEG-Bisaminen zu vernetzen⁸².

Eine andere Form der Vernetzung ist der Einsatz von Enzymen⁷⁴. So können wässrige Lösungen von Glutaminylgruppen funktionalisierten PEG-Molekülen und Polylysin-co-phenylalanin mit Transglutaminase zu Hydrogelen umgesetzt werden⁸³. Polysaccharide, die mit Phenolgruppen modifiziert werden, lassen sich mit Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid vernetzen^{37, 84, 85}.

Zudem ist durch hochenergetische Strahlung wie γ -Strahlung⁸⁶ oder Elektronenstrahlen⁸⁷ die Umsetzung von Polymeren zu Hydrogelen möglich. Die Vorteile dieser Methode sind die

milden Bedingungen wie Raumtemperatur und physiologischer pH-Wert und der Verzicht von möglicherweise toxischen Vernetzungsreagenzien. Da allerdings auch einzubindende Wirkstoffe durch die Strahlung beschädigt werden können, ist auch hier eine Beladung erst nach der Gelbildung möglich⁷⁴.

Eine der wichtigsten Reaktionsformen zur Herstellung von Hydrogelen ist die Vernetzung über die radikalische Polymerisation. Da diese Vernetzungsvariante bei der Herstellung von Hydrogelen aus Hydroxyethylstärkederivaten eingesetzt wird, wird diese ausführlicher betrachtet. Bei dieser Vernetzungsart ergeben sich zwei Möglichkeiten der Hydrogelherstellung.

Zum einen lassen sich Monomere mit geringem Molekulargewicht in Gegenwart eines Vernetzungsreagenzes direkt zu einem Gel zu polymerisieren. So lässt sich z.B. in Gegenwart des difunktionellen Vernetzungsreagenzes Ethylenglycoldimethacrylat durch Polymerisation von Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) ein Hydrogel herstellen⁸⁸. Mit dieser Hydrogelherstellungsvariante können auch Hydrogele aus HEMA und anderen Comonomeren wie Methacrylsäure (pH-sensitiv)⁸⁹ oder *N*-Isopropylacrylamid (temperatursensitiv)⁹⁰ hergestellt werden, die sich durch verschiedene Aktoren in ihrem Quellverhalten beeinflussen lassen⁵¹, wodurch ein „intelligentes“ bzw. schaltbares Materialverhalten erreicht wird.

Zum anderen lassen sich wasserlösliche Polymere mit polymerisierbaren Funktionen modifizieren, die dann in einem zweiten Reaktionsschritt durch radikalische Polymerisation zum Gel umgesetzt werden. Die unterschiedlichsten Polymere (synthetische, halbsynthetische und natürliche) werden mit dieser Variante der chemischen Vernetzung umgesetzt, um Hydrogele zu erhalten⁷⁴. Durch die photoinitiierte Polymerisation lassen sich die Hydrogele sogar unter physiologischen Bedingungen in Gegenwart von Gewebe, Zellen und DNA herstellen⁹¹.

Im Folgenden werden radikalisch vernetzte Hydrogele aus natürlichen neutralen wasserlöslichen Polymeren am Beispiel von Dextran betrachtet, da diese Studien die Grundlagen dieser Arbeit zur Modifizierung des ebenfalls ungeladenen Polysaccharids Hydroxyethylstärke bilden. Ungeladene Polymere haben gegenüber geladenen Polymeren den Vorteil, dass sie die einzubindenden Proteine nicht durch Wechselwirkungen destabilisieren bzw. deaktivieren⁹². Dextran wird daher verstärkt als Grundgerüst eingesetzt, um abbaubare Hydrogele als DDS für Pharmaproteine zu erhalten⁷⁴. Dextran ist ein bakteriell hergestelltes Polysaccharid, das hauptsächlich aus α -1,6-verknüpften D-Glucopyranose-Einheiten aufgebaut ist und das ebenfalls α -1,2, α -1,3 und α -1,4-Verzweigungen in verschiedenen Anteilen aufweist⁶⁸. Die pharmakologischen Aktivitäten und Nebenwirkungen von Dextran

sind bekannt, da Dextrane mit geringen Molekulargewichten (Gewichtsmittel M_w zwischen 40000 und 100000 g/mol) schon länger als Blutplasmavolumenexpander verwendet werden⁹³. Die erste Funktionalisierung von Dextran zu einem über radikalinduzierte Polymerisation vernetzbaren Polymer erfolgte mit Glycidylmethacrylat in wässriger Lösung⁹⁴. Mit dieser ließen sich auch Enzyme unter nahezu vollständigem Erhalt ihrer Reaktivität in einer Emulsionspolymerisationstechnik in Mikrosphären immobilisieren lassen. Durch die Reaktion in Wasser lassen sich mit dieser Methode nur Derivate mit geringen Substitutionsgraden an vernetzbaren Substituenten und nur unkontrolliert herstellen, da Glycidylmethacrylat vor und nach der Reaktion mit dem Polymer hydrolysiert wird⁷⁴. Durch den Wechsel zu einem aprotischen Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid (DMSO) kann Dextran kontrolliert mit Glycidylmethacrylat zu Dextranmethacrylat derivatisiert werden^{69, 95, 96}. Die Wahl der Methacrylsäurefunktion als vernetzbare Gruppe hat mehrere Gründe. Zum einen sind Acrylate und Methacrylate die am meisten untersuchten polymerisierbaren Vernetzungsfunktionalitäten in biomedizinischen Anwendungen⁹¹. Dabei zeigen Methacrylate eine geringere Toxizität als die reaktiveren Acrylate, die auch als Vernetzungssubstituent in Frage kämen⁹⁷. Zum anderen ist mit der Methacrylsäure ein Substituent gegeben, der einerseits über eine polymerisierbare Vinylbindung verfügt, und der andererseits durch Modifikation an der Carboxylgruppe eine große Zahl von weiteren Verbindungen ermöglicht. Methacrylatgruppen, die an wasserlösliche Polymere gebunden sind, verhalten sich sensitiv gegenüber Hydrolyse unter physiologischen Bedingungen¹⁷. Nach der Polymerisation erweisen sich die Methacrylatester allerdings gegenüber Hydrolyse als sehr beständig^{25, 98}. Hydrogele aus diesen Polymeren lassen sich somit unter physiologischen Bedingungen nur abbauen, wenn das Polymerrückgrat durch das entsprechende Enzym hydrolysiert wird⁷⁴. Im Fall von Dextranbasierten Polymeren fällt dabei die Wahl auf Dextranase. So lässt sich das Polymer Dextranmethacrylat auch mit höheren Substitutionsgraden durch Dextranase abbauen⁹⁹, allerdings zeigen die Hydrogele aus diesem Material einen vollständigen Abbau nur bei sehr geringen Substitutionsgraden ($DS < 0,04$). Um einen vollständigen Abbau der Hydrogele zu erhalten, bietet sich der Einbau von hydrolytisch sensitiven Strukturen zwischen dem Polymerrückgrat und der polymerisierbaren Gruppe⁷⁴ an, um die Hydrolyse der Vernetzungen als Abbaumechanismus einsetzen zu können. Bei Dextranen lassen sich Carbonatester und deren Kombination mit Milchsäuregruppen als hydrolysierbare Funktionen einbringen. Die Modifizierung von Dextran mit Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) zu Dextranhydroxyethylmethacrylat (dex-HEMA) oder mit HEMA und Lactatspacern zu HEMA-Oligolactatderivatisiertem Dextran (dex-lactat-HEMA) führt zu abbaubaren

Hydrogelen⁹⁶. Nach der Polymerisation dieser Derivate werden die Gele unter physiologischen Bedingungen abgebaut. Auf Grund der (Carbonat-)estergruppen in den Spacern werden als Abbauprodukte Dextran, Milchsäure und kurze Oligohydroxyethylmethacrylatfragmente erhalten. Dabei variiert die Abbaudauer zwischen einem Tag bis zu drei Monaten, was über die Art der Estergruppe in den Vernetzungsgruppen, die Vernetzungsdichte des Gels und die Länge des Lactatspacers beeinflusst werden kann^{25, 100}. Diese Art der Modifizierung von Dextranen ist somit eine wirksame Methode um polymerisierbare wasserlösliche Polymere herzustellen, die sich zu Hydrogelen umsetzen lassen. Diese Methode lässt sich auch auf andere Polysaccharide anwenden, so dass möglicherweise auch besser verträglichere Drug Delivery Systeme herstellbar sind.

Um die Verträglichkeit der gebildeten Hydrogele zu erhöhen, bietet sich die Variation des Polysaccharids an. Hydroxyethylstärke als Basispolymer ist ein viel versprechendes Material, da die Biokompatibilität durch den jahrelangen Einsatz als Blutplasmavolumenexpander wie beim Dextran erwiesen ist²¹. Hydroxyethylstärke ist dabei besser verträglich als Dextran⁹³. Die Modifizierung von Hydroxyethylstärke mit Hydroxyethylmethacrylat über eine Carbonatestergruppe führt wie bei Dextran zu polymerisierbaren Polymeren, die sich durch Photopolymerisation in wässriger Lösung zu Hydrogelen vernetzen lassen²²⁻²⁴. Hydroxyethylstärke zeigt abhängig vom MS allerdings ein anderes Lösungsverhalten als Dextran, wodurch auch bei den modifizierten Polysacchariden Unterschiede in dem Lösungsverhalten zu beobachten sind. Dies führt bei den Hydroxyethylstärkederivaten zur Phasenseparation während des Vernetzungsprozesses und dem Ausbilden von Kanalstrukturen in den Hydrogelen²³. Auf weitere Ausführungen zu Hydroxyethylstärke, deren Modifizierung und neuen Erkenntnissen zur Modifizierung von Hydroxyethylstärke zu Hydroxyethylstärkehydroxyethylmethacrylat sei an dieser Stelle auf das Kapitel 2.2 verwiesen. Neben der besseren Verträglichkeit hat Hydroxyethylstärke zudem die entscheidende Eigenschaft, dass sie wie Dextran in wässriger Lösung mit wässrigen Polyethylenglykollösungen ein wässriges Zweiphasensystem ausbildet. Es lassen sich analog zu Dextran¹⁴ unter milden Bedingungen Mikrosphären herstellen, die als Drug Delivery Systeme für Pharmaproteine eingesetzt werden können²³.

2.1.1 Hydrogele in Drug Delivery Systemen

Ein Drug Delivery System (DDS) ist definiert als System, dass in der Lage ist, einen aufgenommenen bioaktiven Wirkstoff an einem bestimmten Wirkungsort über eine spezifische Rate freizusetzen¹⁰¹. Das DDS sollte leicht und ausreichend mit dem Wirkstoff zu beladen sein, den Wirkstoff nicht beeinträchtigen, in eine gut verabreichbare Applikationsform überführbar sein und zudem biokompatibel und bioabbaubar sein^{41, 102}. Bei DDS aus Hydrogelen lassen sich zwei Arten unterscheiden. Zum einen die DDS, bei denen erst die Hydrogele gebildet werden, die später mit Wirkstoff beladen werden. Dabei lassen sich alle Varianten der Hydrogelherstellung nutzen, da die Hydrogele gereinigt werden können, bevor sie mit dem Wirkstoff in Kontakt kommen. Allerdings müssen die Hydrogele bei dieser Variante auch langwierig beladen werden, da der Wirkstoff zeitaufwändig in das DDS diffundieren muss. Die Freisetzung des Wirkstoffs erfolgt dabei relativ schnell durch Diffusion; eine Degradation des Netzwerks ist für die Freisetzung nicht notwendig.

Als andere Variante kann das Hydrogel in Gegenwart der Wirkstoffe gebildet werden. Die Auswahl an Herstellungsmöglichkeiten ist limitiert, da eine Schädigung des Wirkstoffs vermieden werden muss. Diese Variante hat jedoch den Vorteil, dass der Wirkstoff direkt in einer Matrix eingebunden wird, deren Maschenweite kleiner sein kann als das hydrodynamische Volumen des Wirkstoffs. Die Freisetzung erfolgt dann nicht mehr ausschließlich über Diffusion, sondern erfordert den zumindest teilweisen Abbau des Netzwerks. Über das Abbauverhalten der Matrix lässt sich dann auch die Freisetzung des Wirkstoffs steuern^{28, 101}.

Um diese zuletzt genannte Variante handelt es sich auch bei der Herstellung von mit Wirkstoff beladenen und auf Dextran oder Hydroxyethylstärke basierenden Hydrogelmikrosphären. Wässrige Lösungen von Dextran und Polyethylenglykol und auch wässrige Lösungen von Hydroxyethylstärke und Polyethylenglykol zeigen Phasenseparation^{12, 23}. Dadurch lassen sich Mischungen dieser wässrigen Lösungen in eine Polyethylenglykolphase und eine Polysaccharidphase auftrennen. Durch die Konzentrationen und das Verhältnis der Polymerfraktionen zueinander lässt sich diese Phasenseparation beeinflussen^{15, 23}. Eine derartige Phasenseparation mit wässrigen Polyethylenglykollösungen zeigt sich ebenfalls bei den Polysaccharidderivaten, die mit vernetzbaren Substituenten funktionalisiert sind^{14, 16, 23}. Durch starkes Rühren der Lösungsgemische entstehen kleine Tröpfchen der dispergierten Phase. Diese kugelförmigen Partikel im Mikrometermaßstab bestehen bei entsprechender Wahl des Verhältnisses zwischen Polysaccharid und Polyethylenglykol aus dem Polysaccharid^{14, 23}. Durch Zugabe eines Photoinitiators zu den

Lösungen lassen sich die vernetzbaren Polysaccharide bei entsprechender UV-Bestrahlung über eine photochemisch radikalinduzierte Vernetzung zu Hydrogelmikrosphären umsetzen^{14, 23}. Wird ein wasserlöslicher Wirkstoff wie ein Protein vor dem Vernetzen in dieser Mischung gelöst, lässt sich der Wirkstoff durch entsprechende Wahl der zugegebenen Salze und Salzkonzentrationen in der Polysaccharidphase anreichern²³ und durch die Vernetzung in den Mikrosphären immobilisieren^{23, 103}. Diese Mikrosphären lassen sich dann für Freisetzungsuntersuchungen einsetzen^{23, 104}. Durch den Einsatz eines wässrigen Zweiphasensystems lassen sich somit die Anforderungen an ein wirksames DDS erfüllen, da auf organische Lösungsmittel verzichtet werden kann und in Gegenwart des Wirkstoffs Hydrogele gebildet werden können.

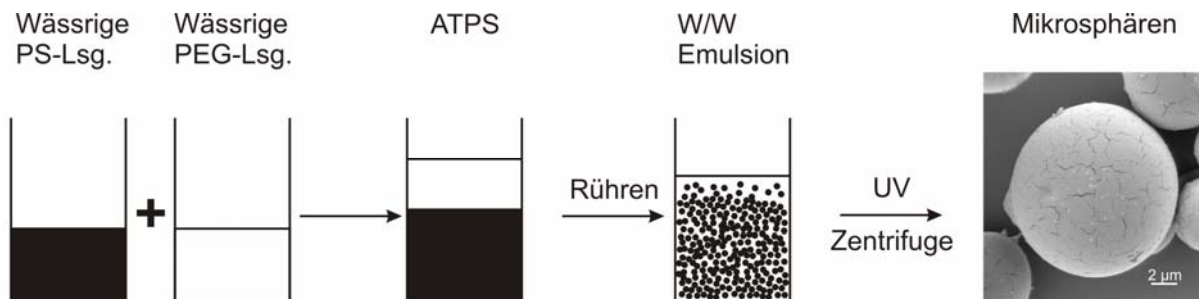


Abb. 3: Mikrosphärenherstellung über ein wässriges Zweiphasensystem, (Erläuterung siehe Text)

Bei der Mikrosphärenherstellung (Abb. 3) wird die wässrige Lösung des vernetzbaren Polysaccharids (Wässrige PS-Lsg.) und die wässrige Lösung des Polyethylenglykols (Wässrige PEG-Lsg.) zusammen gegeben. Es bildet sich ein wässriges Zweiphasensystem (ATPS) aus. Durch Rühren ergibt sich eine Wasser in Wasser (W/W) Emulsion. Durch Bestrahlen vernetzen die polymerisierbaren Polysaccharide im Emulsionströpfchen zu Mikrosphären. Diese lassen sich durch Waschen mit Wasser und Zentrifugation von der PEG-Phase abtrennen. Nach Gefriertrocknen sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Mikrosphären möglich.

Neben dem wässrigen Zweiphasensystem lassen sich HESHEMA-Derivate, analog zu den Dextran-Derivaten, auch in Gegenwart von Proteinen zu größeren Gelkörpern beliebiger Form wie z.B. Gelzylindern umsetzen.

Die mit diesen Methoden dargestellten DDS zeigen zuversichtlich stimmende Freisetungsverhalten. Die Arbeiten an den modifizierten Dextranen sind weiter fortgeschritten als die an den Hydroxyethylstärke-derivaten, so dass hier bereits erste *in vivo* Daten zur Verfügung stehen. Die Gele zeigen sowohl in implantierten Hydrogelzylindern als

auch in Form von einspritzbaren Mikrosphären gute Biokompatibilität. Dextran-Methacrylatderivate (dexMA) sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht abbaubar. Die anderen untersuchten Dextranderivate wie dex-HEMA und dex-lactat-HEMA zeigen nach der subkutanen Implantation in Ratten vergleichbare Abbauraten des Hydrogels wie *in vitro*, was darauf hindeutet, dass der Abbau hauptsächlich durch die chemische Hydrolyse bestimmt wird¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Diese abbaubaren Dextran-Hydrogele sind somit brauchbare Systeme für die kontrollierte Freisetzung von pharmazeutischen Proteinen^{25, 108}.

Ob die Drug Delivery Systeme, die als polymerisierbares Polysaccharid Hydroxyethylstärke-derivate beinhalten, sich ebenso gut für die Immobilisierung von pharmazeutischen Proteinen eignen, müssen weitere *in vitro* und *in vivo* Tests zeigen. Zu diesen Untersuchungen sei auf die Dissertation von A. Schwoerer¹⁰⁴ verwiesen.

2.2 Hydroxyethylstärke und ihre Derivate

Hydrogele als wirksame Drug Delivery Systeme für pharmazeutische Proteine sollten aus einem biokompatiblen Polymer bestehen, damit das Hydrogel und seine Abbauprodukte den Patienten möglichst gering belasten und eine Heilung nicht durch das DDS beeinträchtigt wird. Ein geeignetes Polymer scheint Hydroxyethylstärke (HES) zu sein.

Auf Grund ihrer guten Biokompatibilität wird Hydroxyethylstärke schon seit langem als Blutplasmaersatzmittel in der Notfallmedizin bei hohen Blutverlusten eingesetzt²¹. Die Wirkung von HES als Blutplasmaexpander besteht darin, das intravaskuläre Volumen aufrecht zu erhalten, die hämodynamischen Bedingungen zu stabilisieren und die Gewebedurchblutung zu verbessern¹⁰⁹. Dabei zeigte sich schon 1966, dass Hydroxyethylstärke sowohl im Tier- als auch im Menschenversuch keinerlei Anzeichen von Toxizität aufweist. Von 16045 menschlichen Probanden, denen Infusionen von Hydroxyethylstärkelösung verabreicht wurden, zeigten nur 0,085% eine anaphylaktische Reaktion. Dieser geringe Prozentsatz entspricht auch dem statistischen Anteil von anaphylaktischen Reaktionen bei Probanden, denen konventionelle Infusionen von menschlichem Albumin Serum verabreicht wurden. Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass Hydroxyethylstärke bei der Behandlung von Patienten mit einem septischen Schock in den USA schon seit Ende der 1970er Jahre als sicherer und effektiver Plasmaexpander im klinischen Gebrauch ist. Diese gute Biokompatibilität ergibt sich wahrscheinlich daraus, dass das Grundgerüst, die Stärke, selbst nicht die Bildung von Antikörpern im Körper bewirkt, da sie strukturverwandt ist zum körpereigenen Leberglykogen²¹. Neben der medizinischen Anwendung rückt HES durch den Einsatz im Doping in die Schlagzeilen, da damit der Hämatokritwert, der Anteil aller zellulären Bestandteile am Volumen des Blutes für Dopingproben gesenkt werden kann und somit das Doping mit anderen körperfremden Mitteln verschleiert wird¹¹⁰.

Das sehr gut biokompatible Material²¹ Hydroxyethylstärke lässt sich, in Anlehnung an die Arbeiten mit Dextran^{13, 69, 95}, mit einem geeigneten Vernetzungsreagenz zu einem Hydrogel umsetzen²²⁻²⁴. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Dextranen zur Hydrogelbildung zeigt die Hydroxyethylstärke auch bessere Verträglichkeiten im Vergleich mit Dextran^{21, 93}. Dextrane bewirken eine Allergisierung und Störungen der Blutgerinnung¹¹¹. Niedermolekulare Hydroxyethylstärken verbessern wie niedermolekulare Dextrane die Fließeigenschaften des Blutes. Allerdings können hochmolekulare Hydroxyethylstärke-Infusionen einen Juckreiz hervorrufen, der mit Latenz nach einer Infusionsbehandlung

auftreten und monatelang anhalten kann. Zudem kann es zu Blutungskomplikationen kommen, die auf einen Interferenz mit Gerinnungsfaktoren zurückgeführt werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten niedermolekularen Hydroxyethylstärke scheinen diese Probleme nicht zu bestehen¹¹¹, was die Wahl der Hydroxyethylstärke als Basismaterial für DDS bekräftigt.

Chemisch betrachtet ist Hydroxyethylstärke das Hydroxyethylderivat von abgebautem Amylopektin²¹ und wird durch die Hydrolyse, Hydroxyethylierung und Ultrafiltration von Wachsmaisstärke hergestellt¹¹². Durch die Hydroxyethylierung kommt es zur Aufspreizung der Stärkemoleküle und damit sowohl zur Viskositätsminderung als auch zur Abbauverzögerung. Weiterhin wird die Wasserbindungskapazität des Polysaccharidmoleküls erhöht. Unsubstituiertes Amylopektin wird im Blut sehr rasch durch α -Amylase gespalten und hat deshalb nur eine intravasale Verweildauer von ca. 10 Minuten. Da jedoch längere Verweildauern bei dem Einsatz als Plasmaexpander gewünscht sind, ist die Hydroxyethylierung nötig¹¹². Hydroxyethylstärke ist ein relativ formstabiles, kugelförmiges Polysaccharid¹¹² und besteht aus einem Stärkegrundgerüst von miteinander glykosidisch verknüpften Glucosen, die statistisch verteilt in C₂-, C₃- und C₆-Position mit Hydroxyethylgruppen substituiert sind (Abb. 4)

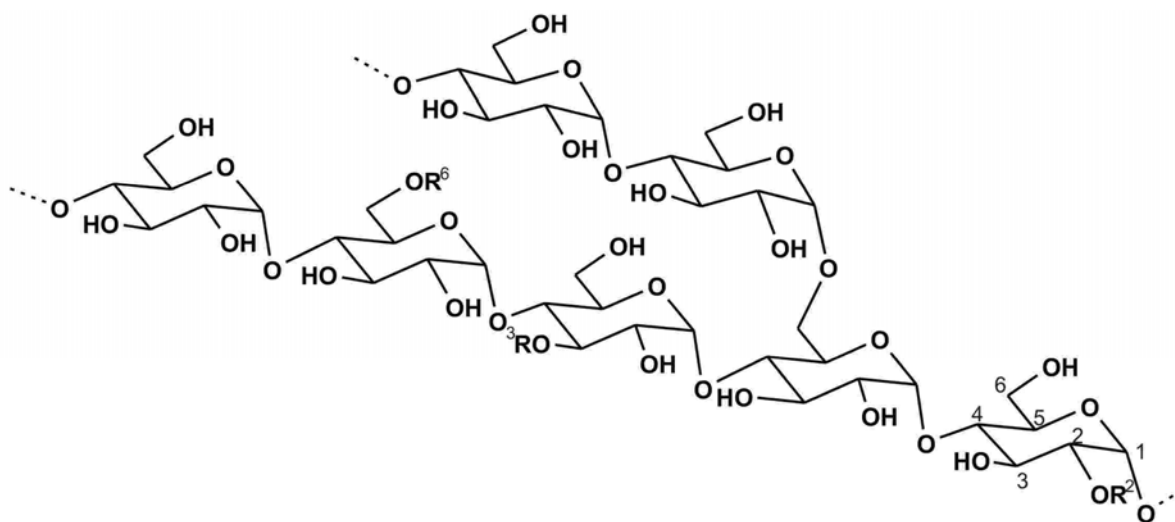


Abb. 4: Struktur von Hydroxyethylstärke, $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ an C-2 Position des Glukoserings, $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ an C-3 des Glukoserings und $R^6 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ an C-6 des Glukoserings¹¹⁰, Mehrfachsubstitution möglich²¹

Zum größten Teil erfolgt die Verbindung der Anhydroglucoseeinheiten über die abgeknickte α -1,4-glykosidische Bindung²¹, wodurch sich helikale Strukturen mit etwa sechs

Glucosemolekülen pro Windung ausbilden. Zudem kommt es noch durch α -1,6-glykosidische Bindungen zu Verzweigungen, die flexibel sind. Die Verknüpfung über die primäre Hydroxygruppe an C-6 bewirkt, dass sich keine orientierenden Bindungen ausbilden, so dass ein Zufallsknäuel entsteht, da die Seitenketten über ein „bewegliches Scharnier“ mit der Grundkette verknüpft sind. Die Positionen C-2, C-3 und C-6 der Anhydroglucoseeinheiten sind in mehr oder weniger statistischer Weise von Hydroxyethylgruppen belegt. Eine Substitution von bereits eingeführten Hydroxyethylgruppen ist auch möglich. Als Summenparameter haben sich die Substitutionsgrade MS und DS zur Beschreibung von Polysaccharidderivaten bewährt, die auf die Erfassung und Quantifizierung der einzelnen Substitutionsposition verzichten.

Der Substitutionsgrad DS (Degree of Substitution) ist definiert als die durchschnittliche Anzahl von substituierten Hydroxygruppen pro Anhydroglucoseeinheit (anhydro glucose unit, AGU) und kann bei Glucanen zwischen 0 und 3 variieren. Der molare Substitutionsgrad MS (molar substitution) ist definiert als die durchschnittliche Anzahl von Substituenten, im Fall der Hydroxyethylstärke die durchschnittliche Anzahl an Hydroxyethylgruppen, pro AGU. Da dieser Substituent selbst auch wieder substituiert werden kann, hat der MS theoretisch kein oberes Limit¹¹³. Ist $MS > DS$, ergibt sich aus den Definitionen Mehrfachsubstitution. Bei Hydroxyethylstärken, die Verwendung als Plasmaexpander finden, liegt die Substitution in der Regel²¹ bei Werten von $MS \approx 0,5$ und einem $DS \approx 0,5$ und es liegt keine Mehrfachsubstitutionen vor. Geringfügig mehrfach substituierte Hydroxyethylstärken ($MS=0,6$ zu $DS=0,5$) werden ebenfalls eingesetzt²¹.

Neben diesen Summenparametern ist das Substitutionsmuster für medizinische Anwendungen interessant. Bei der Bestimmung der Substitutionsmuster werden die einzelnen, unterschiedlich substituierten Anhydroglucoseeinheiten ermittelt, die statistisch auf die einzelnen Polymermoleküle verteilt sind. Die Abbaukinetik von Hydroxyethylstärke im Körper wird durch das Substitutionsmuster mitbestimmt, da C-6-substituierte Stärken schneller durch α -Amylase gespalten werden als überwiegend in C-2-substituierte Stärken²¹. Über gaschromatische Verfahren ist es möglich, DS-, MS-Werte und das Substitutionsmuster von Hydroxyethylstärke auf der Monomerebene zu bestimmen²¹. Der DS von HES lässt sich zudem auch über ¹H-NMR bestimmen¹¹⁴.

Bei der als Grundgerüst verwendeten Hydroxyethylstärke handelt es sich um eine Hydroxyethylstärke der Fa. FRESENIUS mit einem mittleren Molekulargewicht von 130000 ± 20000 g/mol, mit einem MS von 0,38-0,45 und einem DS vom 0,32-0,40, sowie einem C-2-/C-6-Substitutionsverhältnis von $>8:1$ ¹¹². Dieses mittlere Molekulargewicht liegt im

niedermolekularen Bereich zwischen 70000 und 200000 g/mol, so dass allergische Reaktionen, wie sie bei höhermolekularen Hydroxyethylstärken beobachtet werden, auszuschließen sind¹¹¹. Die Charakteristik der verwendeten HES entspricht der einer als Plasmaersatzmittel üblich verwendeten Hydroxyethylstärke.

Um Hydrogele aus Hydroxyethylstärke-Derivaten herzustellen, müssen diese mit vernetzbaren Funktionalitäten ausgestattet werden. Damit die Eigenschaft der Phasenseparation der wässrigen Lösungen der Hydroxyethylstärke-Derivate und Polyethylenglykol auch zur Herstellung von Mikrosphären genutzt werden kann, müssen die Hydroxyethylstärke-derivate über einfache Polymerisationsverfahren vernetzt werden können. Als gute Vernetzungsmethode hat sich die UV-Licht induzierte Vernetzung mit Hilfe eines wasserlöslichen Photoinitiators bewährt. Der am besten verträglichste wasserlösliche Photoinitiator für biomedizinische Applikation ist Irgacure 2959 von CIBA Geigy, Basel^{115, 116}. Dieser Initiator zerfällt unter UV-Licht in zwei Radikale, die Radikalreaktionen zur Vernetzung starten können (siehe Abb. 5)

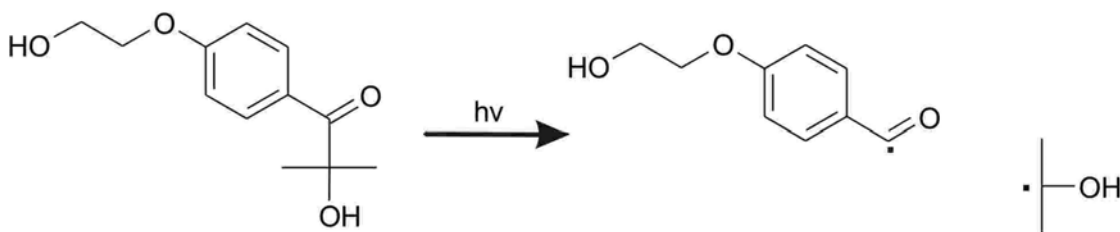


Abb. 5: UV-induzierter Zerfall von Irgacure 2959¹¹⁶

In vitro Zellkompatibilitätstests mit Fibroblasten zeigen für Irgacure 2959 sehr gute Verträglichkeiten¹¹⁶. Die Einbettung von Chondrocyten, Knorpelgewebe bildende Zellen, in ein Hydrogel mit über Irgacure 2959 photovernetztem acyliertem Polyvinylalkohol verläuft ebenfalls erfolgreich. Bei achtminütiger Bestrahlung mit $\sim 8 \text{ mWcm}^{-2}$ bei 365 nm überleben nahezu alle eingesetzten Chondrocyten den Gelbildungsprozess¹¹⁶.

Die Vernetzung über eine photoinduzierte radikalische Reaktion ist nur möglich, wenn das Polymer über reaktive Doppelbindungen verfügt. Somit ist eine Modifikation der HES mit Substituenten, die Doppelbindungen aufweisen, nötig. Diese neuen HES-Derivate werden, da eine Verwendung als DDS für Proteine im Vordergrund steht, in wässrigem Medium eingesetzt, wodurch die Auswahl an vernetzbaren Substituenten limitiert wird. Neben der Wasserlöslichkeit sind durch den geplanten Einsatz als DDS auch andere Faktoren bei der

Wahl des Substituenten zu beachten: einfache Verfügbarkeit, Reaktivität, Funktionalität und Biokompatibilität.

Diese Kriterien werden sehr gut von der Stoffklasse der Methacrylate erfüllt, da sie zum einen über eine polymerisierbare Vinyl-doppelbindung verfügen und zum anderen durch die Estergruppe eine Vielzahl von unterschiedlich reaktiven Gruppen zur Verfügung stehen, über die das Polymerrückgrat der Hydroxyethylstärke mit der Methacrylatfunktion modifiziert werden kann. Methacrylate zeigen dazu auch eine geringere Toxizität als die reaktiveren Acrylate, die auch als Vernetzungssubstituent in Frage kämen⁹⁷.

Am einfachsten lässt sich ein Polysaccharid mit Glycidylmethacrylat zum Polysaccharidmethacrylat umsetzen, wie es für Dextran schon gezeigt wurde⁹⁵.

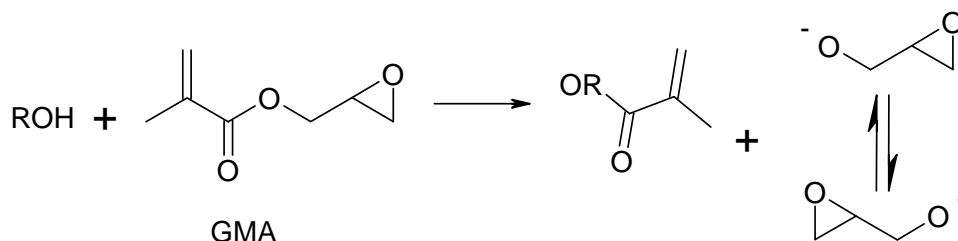


Abb. 6: Umsetzung einer Hydroxyfunktion mit Glycidylmethacrylat (GMA) zum Methacrylatester und Glycidol als Abgangsgruppe⁹⁵

Diese Reaktion ist sehr schnell und einfach, allerdings auf das Vorhandensein von guten Abgangsgruppen wie Glycidol angewiesen⁹⁵. Bei den Arbeiten zur Derivatisierung von Dextranen mit Methacrylaten hat sich herausgestellt, dass Methacrylatester an Dextranen im Polymer abbaubar sind, aber nach Vernetzung durch Polymerisation zum Hydrogel eine hohe Beständigkeit unter physiologischen Bedingungen aufweisen^{25, 98}. Durch entsprechende körpereigene Enzyme erfolgt der Abbau des Hydrogels über den Abbau des Polymerrückgrates¹³.

Über die Variation der Art der Bindung der Methacrylatfunktion an das Polymer lässt sich die Abbaubarkeit beeinflussen⁷⁴. Durch Einführung von hydrolytisch abbaubaren Carbonatesterfunktion lassen sich abbaubare Hydrogele herstellen, wie am Beispiel von Dextran-Derivaten, die mit Hydroxyethylmethacrylat zu dex-HEMA und mit Hydroxyethylmethacrylat-Lactatgruppen zu dex-lactat-HEMA nach Aktivierung mit Carbonyldiimidazol synthetisiert wurden, gezeigt werden konnte²⁵. Mit dieser Form der Derivatisierung lassen sich Substituenten, die über Hydroxyfunktionen verfügen, mit denen der Polysaccharide koppeln (Abb. 7).

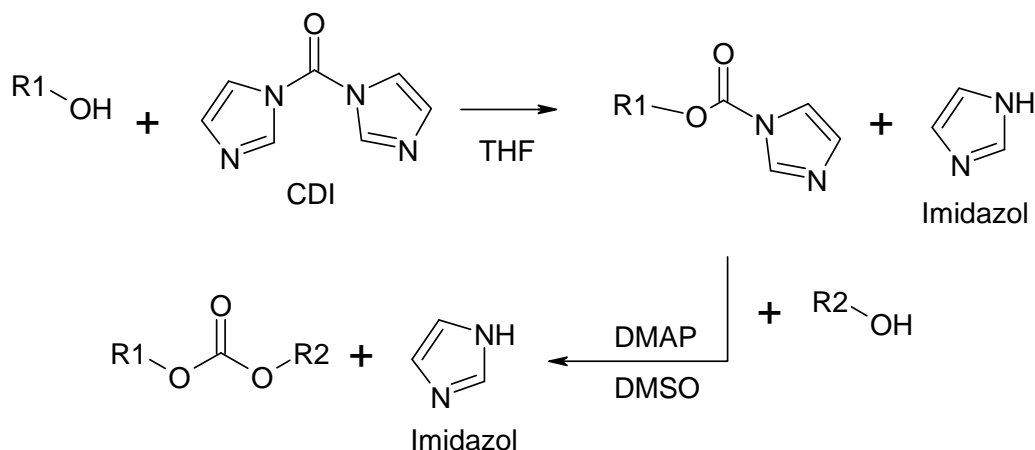


Abb. 7: Carbonatesterbildung zwischen zwei Hydroxyfunktionen via CDI-Kupplung

Der Methacrylsäure tragende Alkohol R_1-OH wird mit Carbonyldiimidazol (CDI) in Tetrahydrofuran (THF) aktiviert. In einem zweiten Schritt wird das Hydroxyfunktionen beinhaltende Polymer in Dimethylsulfoxid (DMSO) unter Zugabe eines Katalysators, Dimethylaminopyridin (DMAP) mit dem aktivierten Carbonylimidazolderivat zur gewünschten Carbonatesterverbindung umgesetzt. In beiden Reaktionsschritten entsteht als Nebenprodukt jeweils Imidazol¹³.

Der Vorteil dieser Reaktion gegenüber der vorher vorgestellten Dextranmodifizierung über GMA liegt darin, dass eine größere Variation an Substituenten möglich ist, da nur eine Methacrylat- und eine Hydroxyfunktion vorliegen müssen, um vernetzbare Substituenten zu erhalten. Durch die Art und Länge des Spacers zwischen der vernetzbaren Gruppe und der Hydroxygruppe sollten somit die Eigenschaften der aus den modifizierten HES-Derivaten hergestellten Hydrogele beeinflussbar werden.

Vorausgegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die Modifizierung von Polysacchariden mit Methacrylatfunktionen via CDI-Kupplung auch anwendbar auf die Umsetzung von Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) mit Hydroxyethylstärke (HES) zu Hydroxyethylstärke-hydroxyethylmethacrylat (HESHEMA) ist^{23, 24}. Dabei wurde die Hydroxyethylstärke HES 200/0,5, Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht M_w von 240000 ± 50000 g/mol und einem $DS \approx MS \approx 0,5$, eingesetzt, die allerdings eine bimodale Molekulargewichtsverteilung aufweist. Um einheitliche Produkte mit engen Molmassenverteilungen nach den Derivatisierungsreaktionen zu erhalten, müssen monomodale Polymere eingesetzt werden. Daher wurde für die vorliegende Arbeit die Hydroxyethylstärke HES 130/0,4 der Fa. FRESSENIUS mit einem mittleren Molekulargewicht

von 130000 ± 20000 g/mol, einem MS von 0,38-0,45 und einem DS von 0,32-0,40 mit monomodaler Verteilung eingesetzt (Abb. 8).

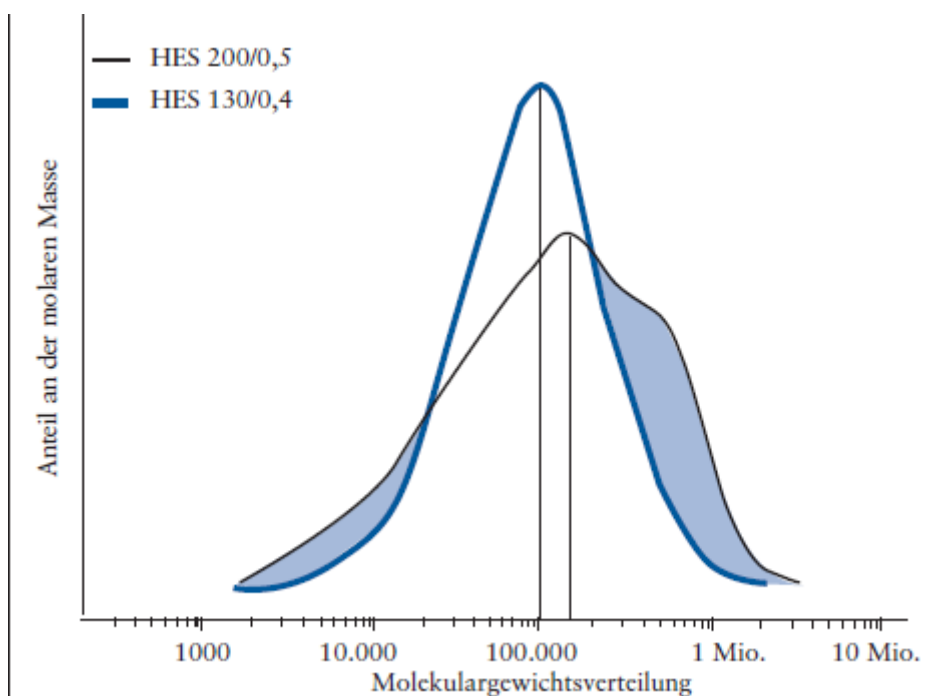


Abb. 8: Molekulargewichtsverteilung von HES 130/0,4 im Vergleich zu HES 200/0,5¹¹²

Neben den weiteren Untersuchungen zur Herstellung von HESHEMA sollen in dieser Arbeit auch Untersuchungen des Einflusses der unterschiedlichen Spacer zwischen der Methacrylatfunktion und dem Hydroxyethylstärkerückgrat erfolgen.

Durch die Umsetzung mit Glycidylmethacrylat sollten HES-Derivate zugänglich sein, die durch die Verkürzung des Abstands zwischen der Methacrylatfunktion und der Hydroxyethylstärke andere Geleigenschaften aufweisen als die schon bekannten HESHEMA-Derivate. Dabei kommt es allerdings zu der Ausbildung eines Esterderivats, das mit Dextran ein anderes Abbauverhalten zeigt als die Carbonatesterderivate²⁵.

Neben der Verkürzung ist auch die Verlängerung des Abstands zwischen der Methacrylatfunktion und dem Hydroxyethylstärkerückgrat durch das Einbringen mehrerer Ethylenoxeinheiten denkbar. Dabei sollte dies durch die zusätzlichen Ethylenoxeinheiten auch zu einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit führen. Die einfachste Variante zur Verlängerung des Abstands ist dabei der Einsatz von Polyethylenglycolmethacrylat als vernetzbarer Substituent, welcher nach CDI-Aktivierung mit Hydroxyethylstärke umgesetzt wird. Da Polyethylenglycolmethacrylat mit unterschiedlich langen Ethylenoxeinheiten zugänglich sind, lassen sich so leicht Variationen der Länge des Spacers zwischen der

Methacrylatfunktion und der Hydroxyethylstärke realisieren. Durch diese Variation der Spacer sollte dann eine umfangreiche Sammlung an Hydroxyethylstärkederivaten zugänglich sein, die Hydrogele mit neuen Eigenschaften ermöglicht.

2.3 Charakterisierung von Hydrogelen

Auf klassischem Weg lassen sich Hydrogele mittels Quellungs- und Rheologiemessungen untersuchen⁸. Der theoretische Hintergrund dieser beiden Messverfahren ergibt sich aus der Gleichgewichtsquellungstheorie und der Gummielastizitätstheorie. Neben diesen Verfahren gibt es noch weitere Methoden zur Charakterisierung von Hydrogelen, die sich die Diffusionsprozesse von im Hydrogel eingebauten Sonden zunutze machen. Klassisch lässt sich die Freisetzung von Farbstoffen aus dem Hydrogel untersuchen, in dem die Konzentration des Farbstoffes im Hydrogel umgebenden Medium detektiert wird¹¹⁷. Mit der Confokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) ist es möglich, die Diffusionsprozesse direkt im Hydrogel zu untersuchen¹¹⁸. Für die CLSM werden Farbstoffe in das Hydrogel eingebracht und durch die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz die Diffusion der Farbstoffe betrachtet, um dadurch Rückschlüsse auf die Matriceigenschaften des Hydrogels zu ziehen^{118, 119}. Da diese Methoden jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, werden diese nicht näher betrachtet.

In dieser Arbeit wurde zudem ein neues Verfahren zur Charakterisierung von Hydrogelen entwickelt. Dabei werden magnetische Nanopartikel (magnetic nano particles, MNPs) als Sonden in das zu bildende Hydrogel gegeben und deren Beweglichkeit mittels Magnetrelaxometrie (MRX) untersucht. So sind Rückschlüsse auf die umgebende Matrix möglich. Dadurch, dass sich durch die entsprechende Wahl der MNPs die Größe des hydrodynamischen Volumens der verwendeten MNPs und die der später einzubindenden pharmazeutischen Proteine ähnelt, lassen sich so Erkenntnisse über die Bedingungen im Hydrogel für die später einzubindenden Pharmaproteine sammeln. Diese Methode wird im Kapitel 2.3.3 näher erläutert.

2.3.1 Quellungsmessungen

Bei Quellungsmessungen werden die Wasser- bzw. Quellmittelaufnahme von vernetzten Hydrogelen über die Zeit verfolgt⁸. Dieser Vorgang lässt sich mit der Gleichgewichtsquellungstheorie deuten²⁶, die sich für Hydrogele mit und ohne ionische Gruppen anwenden lässt. Da die hergestellten Hydrogele über keine ionischen Gruppen verfügen, beschränken sich die folgenden Ausführungen auf die Flory-Rehner-Theorie⁹, die auf zwei wichtigen Annahmen basiert. Zum einen können die vernetzten Polymerketten als ein ideales Knäuel angesehen werden, d.h. der Abstand der Kettenenden einer Polymerkette

ist sehr viel kleiner als die wirkliche Länge der Kette. Zum anderen gilt die Annahme, dass die Vernetzungspunkte (Crosslinks) durchschnittlich tetrafunktional sind (s. Abb. 1).

Bei Quellungsmessungen können drei unterschiedliche Größen analysiert werden:

1. Die Menge von nicht vernetztem Polymer, welches sich aus dem Gel extrahieren und separieren lässt, die als Solfraktion bezeichnet wird.
2. Die Molekulargewichtsverteilung der Polymere aus der Solfraktion.
3. Die Menge des vernetzten Polymers, die Gelfraktion genannt wird, und deren Quellungsgrad.

Die Daten über die Solfraktion sind Messwerte, die nur im weiteren Sinne in Quellungsmessungen berücksichtigt werden müssen. Der Fokus liegt bei Quellungsmessungen auf der Gelfraktion, deren Quellungsgrad bestimmt werden kann. Dieser wird oft durch die massenbezogene Gleichgewichtsquellungsrate q und die volumenbezogene Gleichgewichtsquellungsrate Q beschrieben. Die massenbezogene Gleichgewichtsquellungsrate q ist gegeben aus dem Quotienten der Masse des zu einem Gleichgewichtszustand gequollenen Gels und der Masse des gleichen Gels vor dem Quellen. Die volumenbezogene Gleichgewichtsquellungsrate Q ist dementsprechend der Quotient aus dem Volumen des gequollenen Gels im Gleichgewichtszustand und dem relaxiertem Volumen derselben Probe. Typische Werte von Q für stark gequollene Gele variieren im Bereich zwischen 5 und 100, können allerdings auch Werte um die 1000 annehmen. Bei moderat gequollenen Gelen⁸ liegen die Werte für Q im Bereich von 1,5 bis 5.

Das Quellen eines Netzwerks ist analog dem Lösen eines Feststoffes in einem Lösungsmittel zu verstehen. Die treibende Kraft dabei ist das Bestreben des Netzwerks Lösungsmittel aufzunehmen, da im gequollenen (gelösten) Zustand die Anzahl der Freiheitsgrade für die Ketten größer ist als im Festzustand, wodurch die Entropie des Netzwerks zunimmt. Beim Quellen eines Netzwerks werden die Polymerketten zwischen den Vernetzungspunkten gedehnt und gehen in eine stärker gestreckte Konfiguration über. Aus dieser Streckung resultiert eine elastische Rückstellkraft. Nimmt der Quellungsgrad des Hydrogels zu, steigt auch diese elastische Rückstellkraft, während aus thermodynamischer Sicht das Bestreben, Lösungsmittel aufzunehmen immer geringer wird. Mit der Zeit stellt sich ein Gleichgewichtsquellungszustand ein, bei dem diese Kräfte ausgewogen sind⁸. Experimentell ist dieser Zustand durch das Erreichen eines Plateauwerts bei der Quellungsaufnahme über die Zeit erkennbar. Die physikalische Situation dieses Zustandes lässt sich mit der freien Gibbsenergie ΔG_{total} folgendermaßen beschreiben²⁷:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{mix} + \Delta G_{el} \quad (1)$$

In dieser Gleichung ist die freie Elastizitätsenergie ΔG_{el} der Beitrag, der aus den elastischen Rückstellkräften der Polymerketten resultiert, die der mit der Quellung zunehmenden Streckung entgegenwirkt. Die freie Mischungsenergie ΔG_{mix} ergibt sich aus dem spontanen Mischen von Quellmittelmolekülen mit den Polymerketten⁹, und ist somit ein Maß für die Kompatibilität des Polymers mit den Molekülen des umgebenden Quellmittels. Diese Kompatibilität wird üblicherweise über die Polymer-Lösungsmittel Wechselwirkungsparameter oder Flory-Huggins-Parameter, χ_1 angegeben²⁷. Die Ableitung von (1) hinsichtlich der Anzahl der Quellmittelmoleküle bei gleich bleibender Temperatur und gleich bleibendem Druck ergibt folgenden Ausdruck mit $\Delta\mu$ als chemischem Potential des penetrierenden Lösungsmittels:

$$\mu_1 - \mu_{1,0} = \Delta\mu_{mix} + \Delta\mu_{el} \quad (2)$$

μ_1 ist hierbei das chemische Potential des Quellmittels im Polymergel, $\mu_{1,0}$ hingegen das chemische Potential des reinen Quellmittels. Im Gleichgewichtszustand muss die Differenz der chemischen Potentiale des Quellmittels inner- und außerhalb des Gels gleich null sein. Daher müssen sich die Änderungen im chemischen Potential aufgrund der Kräfte durch das Mischen und die elastischen Rückstellkräfte gegenseitig ausgleichen⁹.

Die Änderung des chemischen Potentials aufgrund der elastischen Rückstellkräfte der Polymerketten lässt sich durch die Theorie der Gummielastizität ermitteln²⁷. Durch die Kombination der beiden aufgeführten Gleichungen ergibt sich ein Ausdruck zur Bestimmung des Molekulargewichts (\overline{M}_c) zwischen zwei Vernetzungspunkten eines neutralen Hydrogels, das in der Abwesenheit eines Lösungsmittels hergestellt wurde:

$$\frac{1}{\overline{M}_c} = \frac{2}{\overline{M}_n} - \frac{\left(\frac{\overline{v}}{V_1}\right) \left[\ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_1 v_{2,s}^2 \right]}{\left(v_{2,s}^{1/3} - \frac{v_{2,s}}{2} \right)} \quad (3)$$

In dieser Gleichung ist \overline{M}_n das zahlenmittlere Molekulargewicht des unvernetzten Polymers, \bar{v} ist das spezifische Volumen des Polymers und V_1 das molare Volumen des Wassers, welches als Quellmittel verwendet wird. χ_1 ist der entsprechende Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter, der die Wechselwirkung des Polymers mit dem Lösungsmittel beschreibt²⁷. Bei der Variablen $\nu_{2,s}$ handelt es sich um den Volumenanteil des Polymers am Gesamtvolumen des zum Gleichgewicht gequollenen Netzwerks. Mit diesem Faktor wird die Menge an Quellmittel beschrieben, die das Hydrogel einlagern kann, was sich durch den Quotienten aus den Polymervolumen V_p und dem gequollenen Gelvolumen V_g ergibt. Diese Größe ist reziprok zu der volumenbezogenen Gleichgewichtsquellungsrate Q , die aus den jeweiligen Dichten des Quellmittels ρ_1 und des Polymeren ρ_2 und der massenbezogenen Gleichgewichtsquellungsrate q gegeben ist¹²⁰.

$$\nu_{2,s} = \frac{V_p}{V_g} = Q^{-1} = \frac{\frac{1}{\rho_2}}{\left(\frac{q}{\rho_1} + \frac{1}{\rho_2}\right)} \quad (4)$$

Somit ergibt sich die volumenbezogene Quellungsrate Q aus der experimentell bestimmten massenbezogenen Quellungsrate q ¹²¹:

$$Q = 1 + \frac{\rho_2}{\rho_1}(q - 1) \quad (5)$$

Die Flory-Rehner-Theorie muss für Hydrogele, die in wässriger Lösung hergestellt wurden, modifiziert werden¹²². Die Gegenwart von Wasser verursacht eine Änderung des chemischen Potentials hinsichtlich der elastischen Rückstellkräfte. Dieser Term trägt zur Teilvolumendichte der Polymerketten während des Vernetzens bei, so dass die Formel (3) übergeht in Formel (6)^{8, 9, 123}:

$$\frac{1}{\overline{M}_c} = \frac{2}{\overline{M}_n} - \frac{\frac{\bar{v}}{V_1} \left[\ln(1 - \nu_{2,s}) + \nu_{2,s} + \chi_1 \nu_{2,s}^2 \right]}{\nu_{2,r} \left[\left(\frac{\nu_{2,s}}{\nu_{2,r}} \right)^{1/3} - \frac{1}{2} \left(\frac{\nu_{2,s}}{\nu_{2,r}} \right) \right]} \quad (6)$$

$\nu_{2,r}$ ist der relaxierte Volumenanteil des Polymers am Gesamtvolumen, der sich unmittelbar nach dem Vernetzen, aber vor dem Quellen einstellt.

Für neutrale Gele, die sehr stark quellen, d.h. deren volumenbezogene Gleichgewichtsquellungsrate Q größer als 10 sind, lassen sich diese Gleichungen zu folgender Gleichung vereinfachen, um den Einfluss des Molekulargewichts zwischen zwei Vernetzungspunkten (\overline{M}_c) auf das Quellverhalten zu verdeutlichen^{57, 120}:

$$Q = \left[\frac{\overline{\nu} \left(\frac{1}{2} - 2\chi_1 \right) \overline{M}_c}{V_1} \right]^{3/5} = \beta (\overline{M}_c)^{3/5} \quad (7)$$

Diese Gleichung lässt sich umstellen zu:

$$\overline{M}_c = \frac{Q^{5/3} V_1}{\left(\frac{1}{2} - 2\chi_1 \right) \overline{\nu}} \quad (8)$$

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Beschreibung des Quellens von Hydrogelen ist die Netzwerkmaschenweite (ξ), die mit der volumenbezogenen Gleichgewichtsquellungsrate Q in folgendem Zusammenhang steht^{120, 124}:

$$\xi = \nu_{2,s}^{-1/3} \left(\overline{r_o^2} \right)^{1/2} = Q^{1/3} \left(\overline{r_o^2} \right)^{1/2} \quad (9)$$

In dieser Gleichung ist $\left(\overline{r_o^2} \right)^{1/2}$ die mittlere Quadratwurzel des Abstands der Netzwerkketten zwischen zwei benachbarten Vernetzungspunkten im ungequollenen Zustand¹²⁰. Dieser Abstand kann über folgende Gleichung bestimmt werden:

$$\left(\overline{r_o^2} \right)^{1/2} = l (C_n N)^{1/2} = l \left(C_n \frac{2\overline{M}_c}{M_r} \right)^{1/2} \quad (10)$$

C_n ist nach Flory das charakteristische Verhältnis, l ist die Länge einer Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung und beträgt $1,54 \text{ \AA}$ und M_r ist das Molekulargewicht der Wiederholungseinheit¹²⁰.

Durch die Kombination der Gleichungen (6) und (7) lässt sich die Maschenweite eines Hydrogelnetzwerks bestimmen und mit den hydrodynamischen Radii der freizusetzenden Moleküle vergleichen¹²⁰.

Quellungsmessungen haben den Vorteil, dass sie mit geringem apparativem Aufwand durchgeführt werden können, und nur eine Waage benötigen. Allerdings ist der Zeitaufwand von Quellungsmessungen relativ hoch. In Abhängigkeit vom Hydrogel kann es mehrere Tage dauern, bis die Gleichgewichtsquellungsrate erreicht wird. Bei Hydrogelen mit geringer mechanischer Stabilität ist zudem die Probenhandhabung schwierig, da die Probenüberführung zwischen Lagermedium und Waage erst ab einer bestimmten Festigkeit der Probe möglich ist. Weiterhin ist bei sehr viskosen Hydrogelproben die Handhabung erschwert. Beim Entfernen der Flüssigkeit auf der Oberfläche des Hydrogels zur Bestimmung des Hydrogelprobengewichts, können auch Teile des Hydrogels abgetragen werden. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist der Umstand, dass zur Auswertung der Daten der Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter bekannt sein muss. Eine schnellere Methode zur Charakterisierung von Hydrogelen ist hingegen die Rheologie, die im Folgenden näher betrachtet wird.

2.3.2 Rheologiemessungen

Die Rheologie ist die Lehre des Fließverhaltens, die sich mit dem Verformungs- und Fließverhalten von Materialien wie Festkörpern, Flüssigkeiten und Gasen beschäftigt¹²⁵. Mit Rheologiemessungen sind daher Aussagen über das viskoelastische Verhalten eines Probenkörpers möglich¹²⁶. Körper können in diesem Zusammenhang Festkörper oder Fluide wie Flüssigkeiten oder Gase sein¹²⁷. Als Modelle haben sich der Newton'sche Dämpfer für die viskosen Eigenschaften der Fluide und die Hooke'sche Feder für das elastische Materialverhalten des idealen Festkörpers etabliert^{127, 128}. Viskoelastische Körper beinhalten beide rheologische Grundeigenschaften^{27, 127, 129}.

Im Oszillationsversuch werden die viskoelastischen Eigenschaften einer Substanz bestimmt, indem auf die zwischen zwei Platten aufgebrachte Probe eine sinusförmige Verformung γ mit einer Kreisfrequenz ω ausgeübt wird (Abb. 9)^{125-127, 130}.

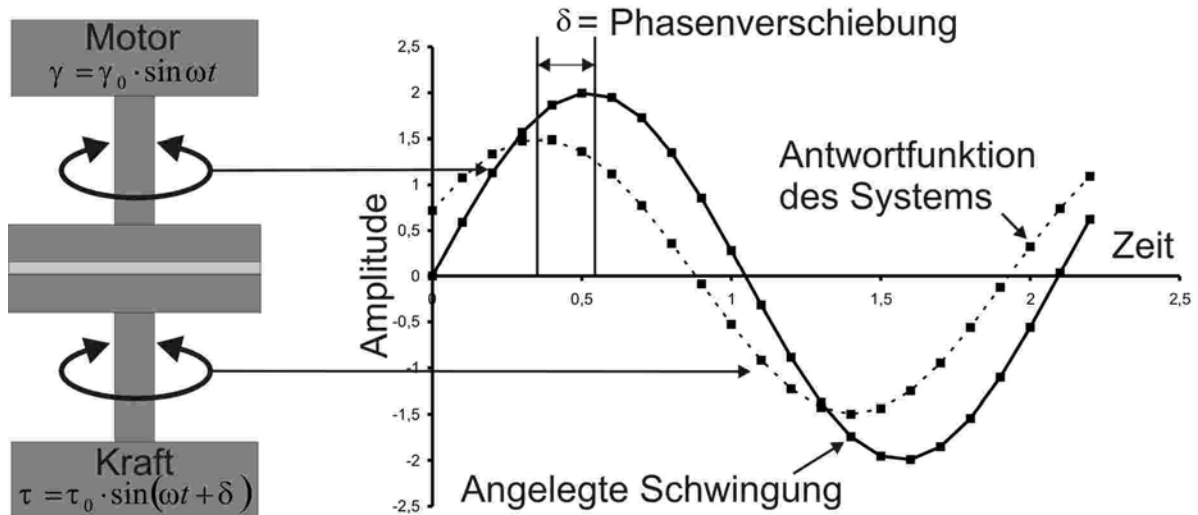


Abb. 9: Oszillationsversuch: durch Motor angelegte sinusförmige Schwingung resultiert in einer um Amplituderniedrigung und Phasenverschiebung verändertes Antwortsignal im Kraftsensor

Durch die sinusförmige Anregung der oberen Platte im Messaufbau ergibt sich eine oszillierende Scherung in dem Probenkörper. Die Scherdeformation erfolgt somit auch sinusförmig und ist geprägt durch die Deformationsamplitude γ_0 und die Schwingungsfrequenz f , die auch als Kreisfrequenz ω angegeben werden kann:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin \omega t \quad (11)$$

$$\omega = 2\pi \cdot f \quad (12)$$

Die Scherdeformation bewirkt in der Probe eine um die Phasenverschiebung δ verschobene Schubspannung τ , die über den Kraftsensor ermittelt wird:

$$\tau = \tau_0 \cdot \sin(\omega t + \delta) \quad (13)$$

Um das Verhalten von viskoelastischen Körpern im Oszillationsexperiment beschreiben zu können, sei zunächst das ideal elastische und das ideal viskose Materialverhalten betrachtet. In einem idealelastischen (Hooke'schen) Körper erfolgt das Antwortsignal auf eine schwingende Beanspruchung instantan (Abb. 10).

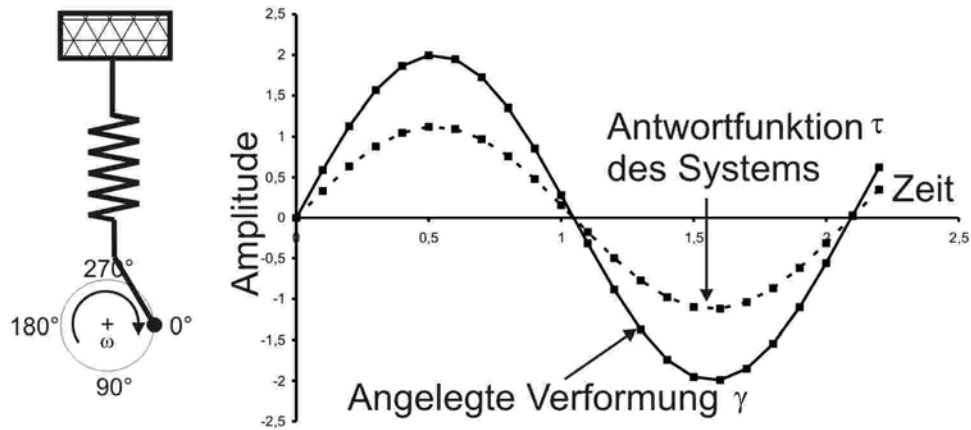


Abb. 10: Oszillierende Verformung eines idealen elastischen Körpers (Feder) und die Reaktion der Schubspannung als Antwortfunktion des Systems¹²⁷

Die Phasenverschiebung δ , auch Phasenwinkel genannt, ist daher gleich null. Die sinusförmige Deformation erzeugt in dem untersuchten Probenkörper eine schwingende Schubspannung. Die Proportionalitätskonstante zwischen der Verformung γ und der Schubspannung τ ist der Elastizitätsmodul G ¹²⁷:

$$\tau(t) = G \cdot \gamma(t) = G \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (14)$$

Bei einer ideal viskosen (Newton'schen) Flüssigkeit erfolgt das Antwortsignal zeitversetzt (Abb. 11). Dabei ergibt sich die Verzögerung mit einem Phasenwinkel δ von 90° ($\delta = \pi/2$).

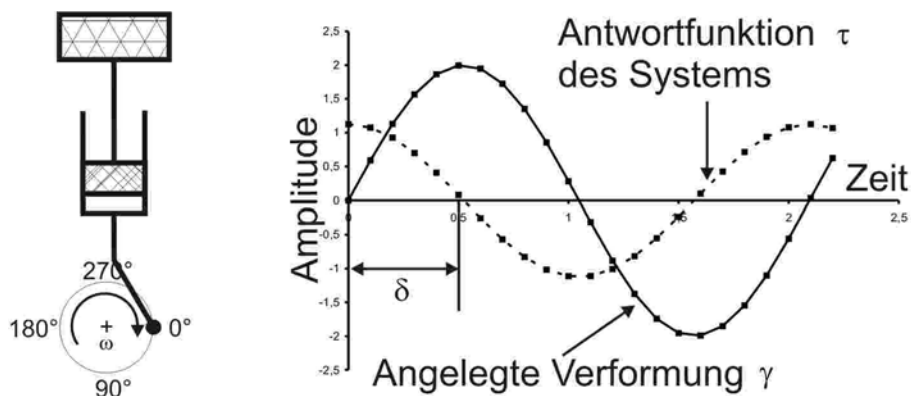


Abb. 11: Oszillierende Verformung einer idealen Newton'schen Flüssigkeit (Stoßdämpfer) mit der Reaktion der Schubspannung als Antwortfunktion des Systems¹²⁷

Wenn bei einem Stoßdämpfer die Verformung am größten ist, ist gleichzeitig das Geschwindigkeitsgefälle der Deformation ($\dot{\gamma}$) gleich Null. Wenn die Verformung die Ruhelage, also die Nulllinie der Amplitude, durchschreitet, ist die Geschwindigkeit der Deformationsveränderung am höchsten, was im Amplitudenmaximum der Schubspannung resultiert. Daher lässt sich die Deformationsgeschwindigkeit folgendermaßen wiedergeben:

$$\dot{\gamma} = d\gamma / dt = \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (15)$$

Wird diese Gleichung in das Newton'sche Gesetz eingesetzt, ergibt sich folgender Zusammenhang, der auch als Sinusfunktion ausgedrückt werden kann:

$$\tau = \eta \cdot d\gamma / dt = \eta \cdot \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) = \eta \cdot \omega \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad (16)$$

Aus Abb. 11 geht hervor, dass der viskose Anteil mit einem Phasenverschiebungswinkel von $\delta = 90^\circ$ gegeben ist. Bei einem phasengleichen Verlauf mit einem Phasenverschiebungswinkel von $\delta = 0$ von der vorgegebenen Verformung zu der resultierenden Schubspannung, handelt es sich hingegen um den elastischen Anteil (Abb. 10). Variiert der Phasenverschiebungswinkel zwischen diesen Extrema ($0^\circ < \delta < 90^\circ$), wird ein viskoelastisches Substanzverhalten beschrieben.

Für viskoelastische Proben ergibt sich der Zusammenhang zwischen Schubspannung und Verformung über den komplexen Schubmodul G^* .

$$\tau = G^* \cdot \gamma \quad (17)$$

Der komplexe Schubmodul G^* ergibt sich aus der realen Komponente, dem Elastizitäts- oder Speichermodul G' und der imaginären Komponente, dem Viskositäts- oder Verlustmodul G'' , der den viskosen Anteil beschreibt. Diese sind folgendermaßen definiert¹²⁷:

$$G^* = G' + iG'' = \tau_0(t) / \gamma_0 \quad (18)$$

$$G' = G^* \cdot \cos \delta = \tau_0 / \gamma_0 \cdot \cos \delta \quad (19)$$

$$G'' = G^* \cdot \sin \delta = \tau_0 / \gamma_0 \cdot \sin \delta \quad (20)$$

Aus dem Speichermodul G' geht hervor, dass die jeweilige Verformungsenergie während eines Schwingungsvorgangs temporär gespeichert wird. Diese Energie lässt sich zurückgewinnen, wenn die Verformung zurückgenommen und anschließend in Gegenrichtung aufgebaut wird¹²⁷. Der Verlustmodul G'' beschreibt den Energieanteil, der durch viskoses Fließen verloren geht. Diese Energie wird in Scherwärme umgewandelt und kann nicht zurückgewonnen werden¹²⁷.

Der Quotient aus Verlustmodul und Speichermodul wird als Verlustfaktor $\tan \delta$ bezeichnet.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (21)$$

Ist der Verlustfaktor kleiner 1, dominieren die Festkörpereigenschaften des viskoelastischen Körpers, während bei Werten größer 1 die viskosen Eigenschaften überwiegen.

Mit dem in Oszillationsmessungen ermittelten Speichermodul G' lässt sich durch Auftragung von $\log \tau$ gegen $\log G'$ der Plateauwert G_p' bestimmen. Dieser markiert den Grenzbereich des für die Auswertung notwendigen linear-viskoelastischen Bereichs zum nicht-linearen-viskoelastischen Bereich¹²⁷. Die Theorien zur Auswertung der Schwingungsrheometrie lassen sich nur anwenden, wenn die Messung im linear viskoelastischen Bereich erfolgt. In diesem Belastungsfenster ist die Deformation der Probe so gering, dass Überstrukturen nicht irreversibel verändert werden. Die Deformation und die dazugehörige Spannung stehen in einem konstanten Verhältnis zueinander¹²⁵.

Die vorgestellten makroskopischen Eigenschaften eines Netzwerks lassen sich durch die thermodynamische Betrachtung mit den Netzwerkeigenschaften in Beziehung setzen. Aus der klassischen Thermodynamik lässt sich die Zustandsgleichung für die Gummielastizität folgendermaßen wiedergeben^{129, 130}:

$$f = \left(\frac{\partial U}{\partial L} \right)_{T,V} + T \left(\frac{\partial f}{\partial T} \right)_{L,V} \quad (22)$$

In dieser Gleichung ist f die Rückstellkraft des Elastomers gegenüber einer Zugkraft, U ist die innere Energie, L die Länge der Ausdehnung, V ist das Volumen und T die Temperatur. Für idealelastische Körper ist der erste Term der Gleichung (22) gleich Null, da durch die Längenänderung keine Dehnung der Bindungen erfolgt¹³⁰. In Elastomeren ist die Streckung des Materials mit einer Erniedrigung der Entropie gekoppelt, da der Abstand der

Polymerkettenenden erhöht wird. Die Rückstellkraft und die Entropie S stehen über die Maxwell-Gleichung in folgender Beziehung:

$$-\left(\frac{\partial S}{\partial L}\right)_{T,V} = \left(\frac{\partial f}{\partial T}\right)_{L,V} \quad (23)$$

Aus der statistischen Thermodynamik lässt sich die Rückstellkraft eines idealelastischen Körpers wie folgt ausdrücken¹³⁰:

$$f = -T \left(\frac{\partial S}{\partial L}\right)_{T,V} = -kT \left(\frac{\partial \ln \Omega(r,T)}{\partial r}\right)_{T,V} \quad (24)$$

In dieser Gleichung ist k die Boltzmann-Konstante, r der Abstand der Polymerkettenenden und $\Omega(r,T)$ die Wahrscheinlichkeit, dass eine Polymerkette mit einem End-zu-End-Abstand r bei der Temperatur T eine bestimmte Konformation annimmt. Bei dieser Gleichung wird vorausgesetzt, dass der Anteil der inneren Energie zur Rückstellkraft konstant oder Null ist, so dass nur entropische Anteile berücksichtigt werden¹³⁰. Für eine einzelne Polymerkette führt Gl. (24) zu folgender Aussage:

$$f = \frac{3kTr}{\overline{r_f^2}} \quad (25)$$

Hierbei ist $\overline{r_f^2}$ der End-zu-End-Abstand der Polymerketten in der Bulkzusammensetzung für lineare Ketten. Wird die Analyse ausgedehnt auf n Netzwerketten, ergibt sich der Ausdruck:

$$\Delta G_{el} = \frac{3nkT}{\overline{r_f^2}} \int_{\left(\overline{r_f^2}\right)^{1/2}}^{\left(\overline{r^2}\right)^{1/2}} r dr \quad (26)$$

ΔG_{el} ist die Änderung der freien Helmholtz-Energie aufgrund der elastischen Verformung. Unter der Annahme, dass keine Volumenänderung während der Verformung erfolgt, ergibt sich nach Integration die statistisch thermodynamische Zustandsgleichung für die Gummielastizität¹³⁰:

$$\tau = \left(\frac{\partial G_{el}}{\partial \lambda} \right)_{T,V} = \frac{\rho RT}{M_c} \frac{\overline{r_0^2}}{r_f^2} \left(\alpha - \frac{1}{\alpha^2} \right) \quad (27)$$

Dabei ist ρ die Dichte des Polymers, $\overline{M_c}$ das mittlere Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten und α die Dehnungsrate. Die Größe $\frac{\overline{r_0^2}}{r_f^2}$ wird als Frontfaktor bezeichnet

und ergibt sich aus dem Quotienten des mittleren Quadrats des End-zu-End-Abstandes der Netzpunkte im gequollenen Zustand des Gels und der entsprechenden Größe für die freien unvernetzten Ketten gleicher Länge und Verteilung¹³¹. Werden die Oszillationsmessungen im nahezu ungequollenen Zustand durchgeführt, kann für den Frontfaktor ein Wert von eins angenommen und dieser somit vernachlässigt werden¹³¹. Über diese Gleichung ist die Schubspannung direkt proportional zu der Anzahl von Netzwerkketten pro Volumeneinheit n ; Diese ist definiert als Quotient aus Dichte und dem Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten:

$$n = \frac{\rho}{\overline{M_c}} \quad (28)$$

Die Gleichung (27) ist nur für ideale Netzwerke gültig, in denen alle Ketten elastisch aktiv sind und an der elastischen Verformung mitwirken. Netzwerkunregelmäßigkeiten wie Verschlaufungen, Verknäulungen und Kettenenden (Abb. 1) werden dabei nicht berücksichtigt. Um die Kettenenden zu berücksichtigen, lässt sich folgende Korrektur durchführen:

$$\tau = \frac{\rho RT}{M_c} \frac{\overline{r_0^2}}{r_f^2} \left(1 - \frac{2\overline{M_c}}{\overline{M_n}} \right) \left(\alpha - \frac{1}{\alpha^2} \right) \quad (29)$$

Dabei ist $\overline{M_n}$ das zahlenmittlere Molekulargewicht der linearen Polymerkette vor dem Vernetzen. Ist $\overline{M_n}$ sehr viel größer als das mittlere Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten $\overline{M_c}$, geht der Quotient im Korrekturterm der Gleichung (29) gegen Null, und ein ideales Netzwerk liegt vor.

Die Kraft pro Netzwerkeinheit ist gegeben durch:

$$\tau = G \left(\alpha - \frac{1}{\alpha^2} \right) \quad (30)$$

So ergibt sich folgender Zusammenhang mit dem Schermodul¹³⁰:

$$G = \frac{\rho RT}{M_c} \frac{\overline{r_0^2}}{r_f^2} \left(1 - \frac{2\overline{M_c}}{M_n} \right) \quad (31)$$

Diese Gleichung ermöglicht die Darstellung der Zusammenhänge zwischen den rheologischen Daten und den Daten des untersuchten Netzwerks. Allerdings gilt diese Gleichung nur im linear viskoelastischen Bereiche, in dem der Werkstoff nahezu elastisch beansprucht wird und somit der Schermodul G_p' in der Gleichung (31) für den Elastizitätsmodul eingesetzt werden kann. Mit dem so ermittelten mittleren Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten $\overline{M_c}$ lassen sich diese Daten mit denen der Quellungsmessungen vergleichen.

Der große Vorteil der Rheologiemessungen gegenüber Quellungsmessungen besteht darin, dass die Module innerhalb weniger Minuten bestimmt und somit schnell Aussagen über die Maschenweite der hergestellten Hydrogele getroffen werden können. Allerdings benötigen die Probenkörper aus den Hydrogelen eine gewisse Stabilität, um in die Messapparatur eingebracht werden zu können. Zudem sind, je nach Messsystem, bestimmte Probengeometrien einzuhalten.

Ein Verfahren, in dem diese mechanische Grundstabilität nicht notwendig ist, stellt die Magnetrelaxometrie (MRX) dar, die im nächsten Kapitel näher beschrieben wird.

2.3.3 Magnetrelaxometrie (MRX)

In der Magnetrelaxometrie (MRX) wird das Relaxationsverhalten von superparamagnetischen Nanopartikeln (MNPs) untersucht. Diese magnetischen Nanopartikel werden in biologischen und medizinischen Anwendungen eingesetzt^{55, 132-134}. Die MNPs bestehen aus einem magnetischen Kern und einer Hülle (Abb. 12).

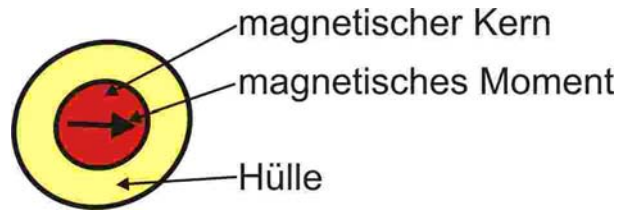


Abb. 12: Schematische Darstellung eines magnetischen Nanopartikels (MNP)

Für biologische Anwendungen besteht der Kern aus magnetischem Material wie Magnetit Fe_3O_4 oder Maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, wohingegen die Hülle aus biokompatiblen Polymeren wie Dextran oder Polyacrylsäure besteht⁵⁵. Neue Varianten von MNPs mit Beschichtungen aus Edelmetallen wie Gold oder anderen magnetischen Materialien wie Eisen, Cobalt und Nickel werden zudem auch erforscht⁵⁵.

Die Magnetrelaxometrie von superparamagnetischen Nanopartikeln wird hauptsächlich in Immunoassays verwendet¹³⁵. Dabei wird die Änderung des Relaxationsverhaltens von MNPs detektiert, die mit der zum biologischen Zielmolekül entsprechenden Antagonistenfunktion modifiziert wurden^{134, 136}. Treffen die modifizierten MNPs und die jeweiligen Zielmoleküle aufeinander, kommt es zur Kopplung dieser beiden. MNPs, an die spezifische Zielmoleküle angebunden sind, zeigen ein anderes Relaxationsverhalten als freie MNPs¹³⁴. Dieser Unterschied im Relaxationsverhalten lässt sich zur Charakterisierung von Hydrogelen nutzen^{22, 137}.

Der Einsatz von MNPs für die Hydrogelcharakterisierung beruht auf der Idee, dass die MNPs als Sonden fungieren, die Information über die Umgebung der MNPs im Inneren der Hydrogelkörper liefern. Mit zunehmender Vernetzung nimmt die Beweglichkeit der MNPs ab, bzw. der Anteil der mechanisch gebundenen MNPs zu^{22, 137, 138}. Durch die Verwendung von MNPs mit ähnlichem hydrodynamischem Volumen wie die später einzubettenden, therapeutischen Proteine, sollten sich somit Erkenntnisse über die Beschaffenheit der Umgebung der Proteine in der Matrix gewinnen lassen²². Mit dieser Methode lässt sich auch die Bildung von Hydrogelen untersuchen, indem die Hydrogele nach gewissen Vernetzungszeitabständen gemessen werden^{22, 137}. Das Untersuchen der Bildung von Hydrogelen mittels der MRX wird in Kapitel 3.3.3 näher betrachtet. Auch der Abbau des Hydrogels und die Freisetzung der MNPs aus der Hydrogelmatrix sind messbar; hier sei auf die Dissertation von A. Schwoerer verwiesen¹⁰⁴.

Bei einer MRX Messung (Abb. 13) wird die MNPs-enthaltende Probe zunächst einem externen magnetischen Feld H_{mag} ausgesetzt.

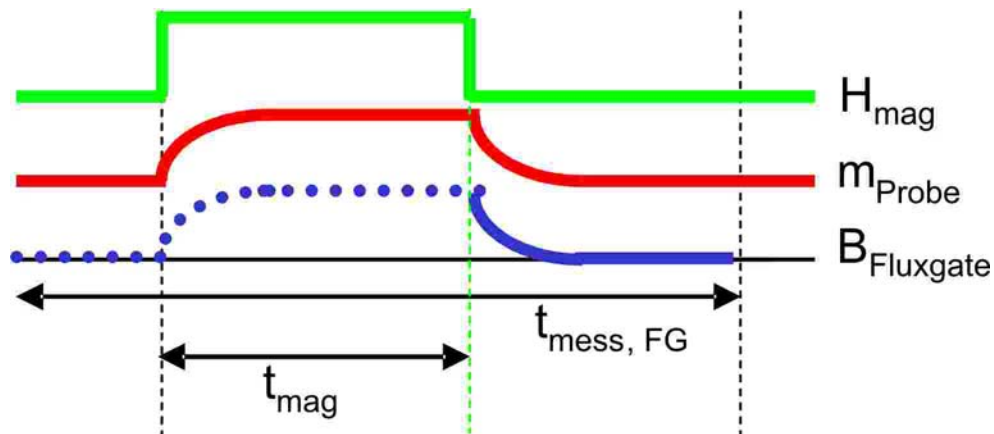


Abb. 13: MRX-Messprinzip; innerhalb der Messdauer $t_{\text{mess, FG}}$ erfolgt über das externe magnetische Feld (H_{mag}) während der Aufmagnetisierungsdauer (t_{mag}) die Ausrichtung der MNPs, was über das differentielle MRX-System (B_{Fluxgate}) gemessen wird und somit die Nettomagnetisierung der MNPs (m_{Probe}) wiedergibt. Nach Abschalten des Magnetisierungsfeldes (H_{mag}) relaxiert das Streufeld der MNPs gegen Null.

Dadurch kommt es zur Orientierung der magnetischen Momente der MNPs in der Probe. Die Nettomagnetisierung der MNPs im Hydrogel (m_{Probe}) wird mit einem differentiellen MRX-System über das Streufeld der Probe gemessen (B_{fluxgate}). Nachdem das Magnetisierungsfeld abgeschaltet wird, relaxiert das Streufeld gegen Null²².

Die Relaxation nach dem Abschalten des Magnetisierungsfeldes kann dabei phänomenologisch nach zwei Mechanismen erfolgen (Abb. 14).

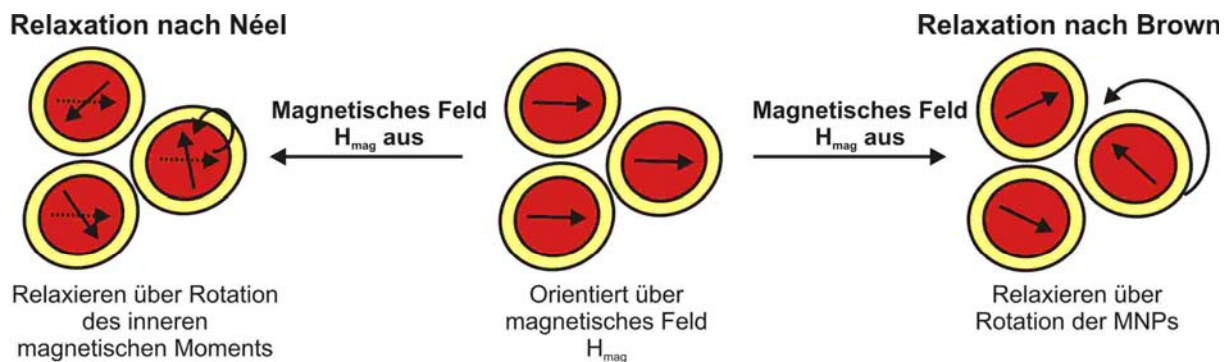


Abb. 14: Relaxation der orientierten MNPs nach dem Abschalten des Magnetisierungsfeldes H_{mag} , zum einen durch Rotation des inneren magnetischen Moments (Néel), zum andern durch Rotation der gesamten MNPs (Brown)

Zum einen kann die Relaxation nach Néel erfolgen. Durch die thermische Energie fluktuiert das magnetische Moment im Kern der MNPs und im Mittel wird eine Nettomagnetisierung

von Null erreicht. Dieser Mechanismus ist vorrangig bei immobilisierten MNPs zu beobachten. Die Zeitkonstante τ_N ist exponentiell abhängig vom Kernvolumen V_k :

$$\tau_N = \tau_0 \cdot \exp\left(\frac{K \cdot V_k}{k_B \cdot T}\right) \quad (32)$$

Dabei entspricht T der Temperatur, K der effektiven Anisotropiekonstante und k_B der Boltzmann-Konstante.

Bei mobilen MNPs erfolgt die Relaxation durch Rotation der kompletten MNPs, Kern inklusive Hülle, was auch als Brown-Relaxation bezeichnet wird¹³⁴. Die Zeitkonstante τ_B ist dabei proportional dem hydrodynamischen Volumen V_h des Partikels und der Viskosität der umgebenden Flüssigkeit η :

$$\tau_B = \frac{3V_h \cdot \eta}{k_B \cdot T} \quad (33)$$

Sind beide Relaxationsmechanismen möglich, so dominiert in einem MRX-Experiment stets der schnellere Mechanismus, wodurch sich eine effektive Zeitkonstante τ_{eff} ergibt:

$$\frac{1}{\tau_{eff}} = \frac{1}{\tau_B} + \frac{1}{\tau_N} = \frac{\tau_B \cdot \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \quad (34)$$

Da das aus dem MRX-Experiment erhaltene magnetische Relaxationssignal aus einer Superposition der beiden Mechanismen resultiert, lässt sich daraus das Verhältnis zwischen frei beweglichen und in ihrer Beweglichkeit gehemmten Nanopartikeln bestimmen.

Das Relaxationsverhalten über die Messzeit t lässt sich phänomenologisch für gebundene MNPs (Néel-Relaxation) mit folgender Formel wiedergeben²².

$$B_{Néel}(t) = B_{off} + B_{gebunden} \ln\left(1 + \frac{\tau_{gebunden}}{t}\right) \quad (35)$$

Für die Brown-Relaxation ungebundener MNPs ergibt sich folgender Ausdruck²²:

$$B_{Brown}(t) = B_{off} + B_{ungebunden} \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau_{ungebunden}}\right)^{\beta}\right) \quad (36)$$

In beiden Formeln ist B_{off} ein systematischer Offset¹³⁴. $B_{gebunden}$ und $B_{ungebunden}$ sind ein Maß für den Anteil an immobilisierten und mobilen MNPs²². β ist ein Wert, der die Größenverteilung der MNPs berücksichtigt und für die verwendeten MNPs charakteristisch ist. Die phänomenologische Zeitkonstante $\tau_{ungebunden}$ ist abhängig von der Viskosität des Mediums. Die Zeitkonstante $\tau_{gebunden}$ für immobilisierte MNPs liegt in der Größenordnung der Magnetisierungszeit und ist unabhängig von der MNP Konzentration²². Die für die MNP-Dispersionen charakteristischen Konstanten lassen sich durch Messung einer mobilen Nanopartikelreferenz ($\tau_{ungebunden}, \beta$) bzw. einer immobilisierten Nanopartikelreferenz ($\tau_{gebunden}$) bestimmen.

Um die Änderung der Beweglichkeit der MNPs in einer Probe quantitativ zu erfassen, die sich durch Änderungen der MNP Umgebung ergeben, wird die Relaxationskurve der Proben zwischen den beiden idealen Verhalten als Überlagerung der beiden Mechanismen beschrieben²²:

$$B(t) = B_{off} + B_{ungebunden} \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau_{ungebunden}}\right)^{\beta}\right) + B_{gebunden} \ln\left(1 + \frac{\tau_{gebunden}}{t}\right) \quad (37)$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bildung von Hydrogelen aus HESHEMA über die MRX untersucht (Kapitel 3.3.3). Durch die Photopolymerisation zum Hydrogel werden die MNPs zunehmend in das Netzwerk eingebettet und immobilisiert, so dass sich ihr Relaxationsverhalten von eher Brown- zu eher Néel-Charakter wandelt. Das Relaxationsverhalten der Hydrogele mit MNPs wird mit (Gl. 37) ausgewertet. Zur Auswertung der MRX-Messung müssen daher zunächst die Proben mit reiner Brown- und Néel-Relaxation hergestellt werden, um die beiden Extreme zu bestimmen. Der Anteil der gebundenen und ungebundenen MNPs wird mit Hilfe der Referenzproben berechnet. Zu Details der Auswertung und der Methodenentwicklung sei an dieser Stelle auf die Dissertation von E. Heim verwiesen¹³⁹. Mit diesem Messaufbau lässt sich nicht nur die Bildung der Hydrogele untersuchen, sondern auch deren Abbau, was für pharmazeutische

Anwendungen von großem Interesse ist. Zu diesen weiterführenden Untersuchungen sei auf die Dissertation von A. Schwoerer verwiesen.

Ein großer Vorteil dieser Messmethode ist ihre Schnelligkeit. Nach vier Sekunden ist eine Messung beendet, so dass 20-fache Wiederholungsmessungen problemlos durchführbar sind. Weitere Vorteile sind die Unabhängigkeit von der mechanischen Stabilität der Gele, was eine einfache Probenhandhabung ermöglicht und die Tatsache, dass die Proben durch die Messungen nicht zerstört werden, was bei Rheologie- und Quellungsmessungen des öfteren auftritt. Ein Nachteil dieser neuen Methode ist die noch eingeschränkte Zugänglichkeit des Messgerätes. Durch die Kooperationspartner des Instituts für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik der TU Braunschweig werden im BMBF-Projekt „Quantamed“ MRX-Messsysteme für den Labortisch entwickelt. Ein Nachteil für mittels Photopolymerisation vernetzende Hydrogelsysteme ist die mit Erhöhung der Konzentration der MNPs zunehmend braune Farbe der Hydrogellösungen, die die Quantenausbeute in der photochemischen Vernetzung erniedrigen und somit Einfluss auf die Vernetzung nehmen. Durch entsprechende Wahl der Konzentration lässt sich allerdings ein Kompromiss zwischen Vernetzbarkeit und Signalstärke im MRX-Messgerät finden. Abschließend lässt sich feststellen, dass mit dieser Messmethode eine komplett neue Charakterisierungsmethode für Hydrogele gegeben ist, die ein großes Potential zur Untersuchung niederviskoelastischer Systeme aufweist.

3. HESHEMA

Ein viel versprechender Substituent aus der Stoffklasse der Methacrylate, mit dem sich HES zu photovernetzbaren Hydrogelen modifizieren lässt, ist Hydroxyethylmethacrylat (HEMA). Dessen Umsetzung mit HES wurde verstärkt untersucht, da dieser Substituent bei der Umsetzung mit Dextran zu dex-HEMA und deren weitere Verwendung als Hydrogelmaterial für DDS bekannt ist⁶⁹.

Neben der Abstandsvariation der Methacrylatgruppe zum Polymerrückgrat durch die Hydroxyethylfunktion lässt sich mit diesem Substituenten auch die Bindungsart des vernetzbaren Substituenten an das Polymerrückgrat variieren. Bei der verwendeten Synthese der HESHEMA-Polymere wird der Substituent über einen Carbonatester angebunden.

3.1 Synthese

Um Hydroxyethylstärke zu einem photovernetzbaren Polymer zu modifizieren, wird zur Herstellung von HESHEMA die Hydroxyfunktion des Hydroxyethylmethacrylats mittels Carbonyldiimidazol (CDI) zum Hydroxyethylmethacrylatcarbonylimidazol (HEMA-CI) aktiviert (Abb. 15)¹⁴⁰.

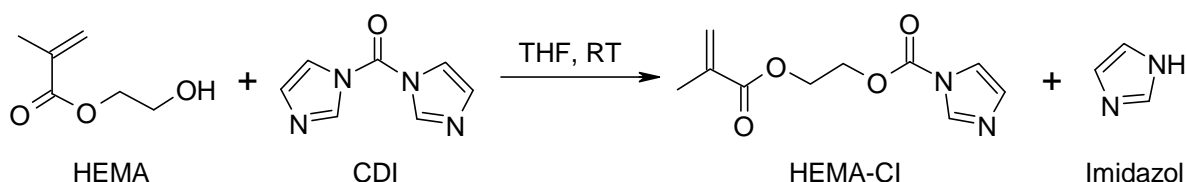


Abb. 15: Aktivierung von Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) mit Carbonyldiimidazol (CDI) zu Hydroxyethylmethacrylatcarbonylimidazol (HEMA-CI) mit Imidazol als Nebenprodukt

Diese aktivierte Form lässt sich in unterschiedlichen Verhältnissen mit Hydroxyethylstärke (HES) zu Hydroxyethylstärke-hydroxyethylmethacrylat (HESHEMA) umsetzen (Abb. 16).

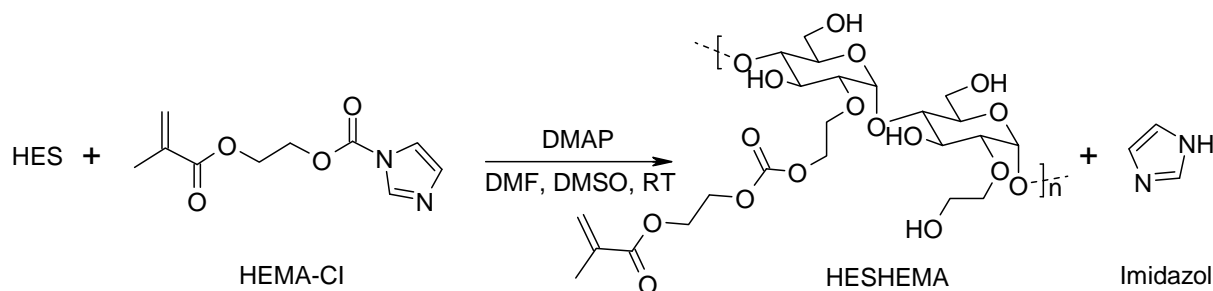


Abb. 16: Synthese von Hydroxyethylstärke-hydroxyethylmethacrylat (HESHEMA) via CDI-Kopplung von Hydroxyethylmethacrylatcarbonylimidazol (HEMA-Cl) mit Hydroxyethylstärke (HES), als Nebenprodukt entsteht Imidazol

Der Reaktionsverlauf unter verschiedenen Reaktionsbedingungen lässt sich durch Probenentnahmen bei unterschiedlichen Reaktionszeiten verfolgen. Die erhaltenen Proben werden nach Aufarbeitung mittels ^1H -NMR Spektroskopie und wässriger Gelpermeationschromatographie (GPC) untersucht.

Die Zusammensetzung der HESHEMA-Derivate lässt sich neben der Reaktionsdauer durch weitere Faktoren beeinflussen:

- Wahl der Reaktionsäquivalente HES und HEMACI
- Konzentration des Katalysators Dimethylaminopyridin DMAP
- Reinheit/Qualität des Edukts HEMACI

3.2 Charakterisierung von HESHEMA

Bei der Charakterisierung der HESHEMA-Derivate steht die Bestimmung des Substitutionsgrades und der Molekulargewichtsverteilung im Fokus. Die Einflüsse der unterschiedlichen Reaktionsparameter in der HESHEMA-Synthese werden mit diesen Techniken untersucht.

3.2.1 Bestimmung des Substitutionsgrades (DS)

Bei der Bestimmung des Substitutionsgrades („Degree of substitution“, DS) von Polysacchariden mit der Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist die eindeutige Separation der Signale des Polymerrückgrates und des Substituenten notwendig. Die Vinylprotonen und die Methylprotonen des HEMA-Substituenten lassen sich gut von den Protonen des

Polymerrückgrates im NMR-Spektrum separieren. Als Beispiel ist ein ^1H -NMR-Spektrum wiedergegeben, an dem die Auswertung erläutert werden soll (Abb. 17).

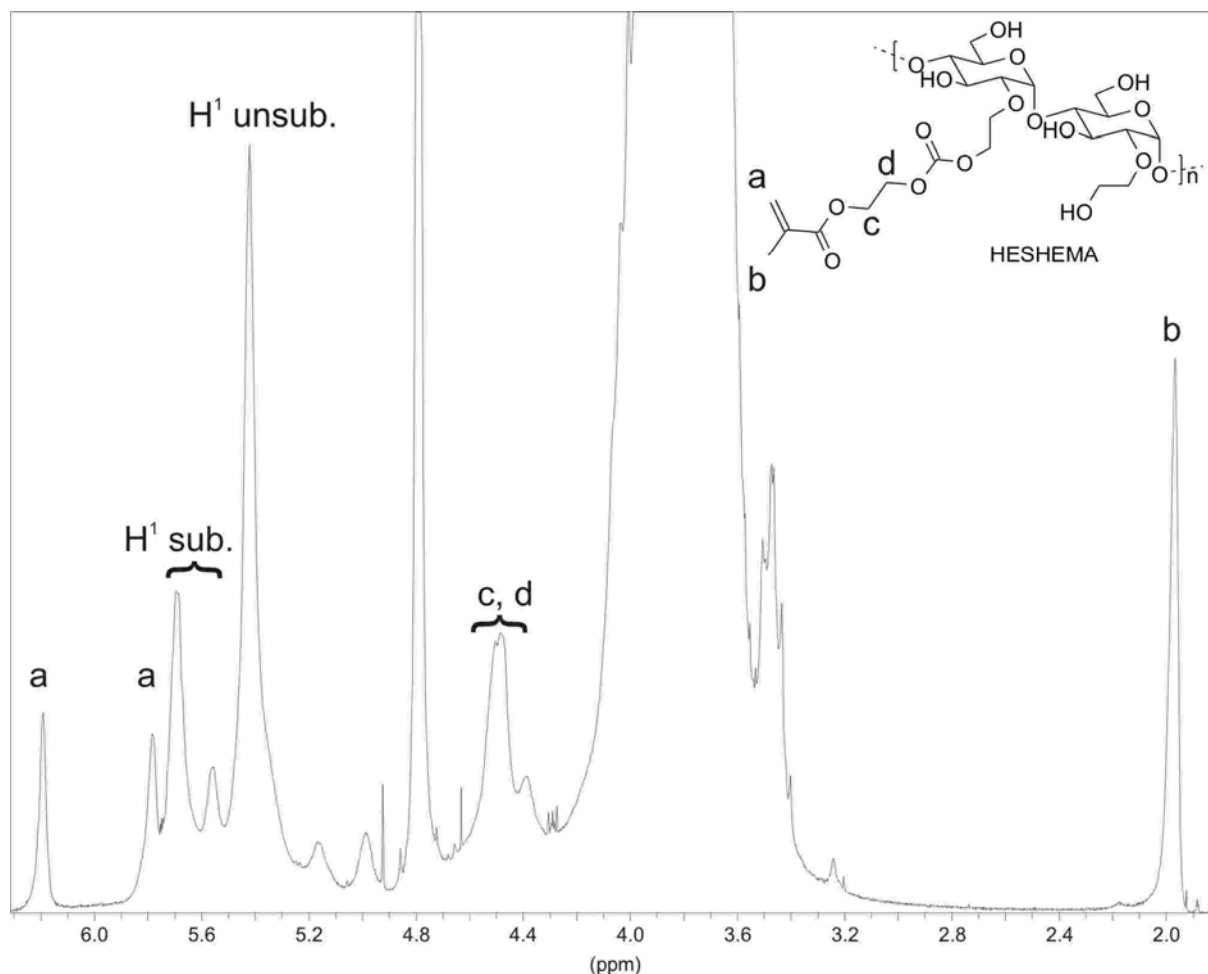


Abb. 17: ^1H -NMR Spektrum von HESHEMA in D_2O (300 MHz)

Die Protonen des Substituenten lassen sich im Vergleich mit der unsubstituierten HES¹¹⁴ folgenden Signalen zuordnen. Ein Vinylproton (a) ergibt ein Singulett bei 6.2 ppm. Das zweite Vinylproton lässt sich dem Singulett bei 5.8 ppm zuordnen, jedoch überlagert es mit den Signalen der H^1 -Protonen der Glucoseeinheiten der HES. Die H^1 -Protonen der substituierten und unsubstituierten Glucoseeinheiten der HES sind den Signalen von 5.7 ppm bis 5.1 ppm zuzuordnen¹¹⁴. Das Multiplett zwischen 4.6 ppm und 4.35 ppm entspricht den Alkylprotonen (c und d) des HEMA-Substituenten. Die Signale zwischen 4.35 ppm und 2.4 ppm entsprechen den 5 Protonen der Glucoseeinheiten (H-2, H-3, H-5, H-6a/b) und den 4 Protonen der Ethylgruppe des Hydroxyethylsubstituenten¹¹⁴. Das Multiplett zwischen 2.15 ppm und 1.65 ppm lässt sich den 3 Protonen der Methylgruppe des HEMA-Substituenten zuordnen.

Der DS lässt sich durch die Division des Integrals des Signals des einen Vinylprotons bei 6.2 ppm (a) durch die Summe der Integrale des anomeren Protons (H^1) der substituierten und unsubstituierten Glucoseeinheiten der HES bestimmen:

$$DS = \frac{I_a}{\sum I_{H^1}} \quad (38)$$

Der Fehler dieses Substitutionsgrades wird durch die prozentuale Abweichung des Integrals des Signals der Methylgruppe bei 2.0 ppm (b) von dem Wert drei wiedergegeben, da das Verhältnis Vinylproton (a) zu Methylprotonen im Idealfall eins zu drei betragen muss, sofern noch keine Vernetzung aufgetreten ist.

3.2.2 Einflussgrößen auf HESHEMA: Verhältnis der Edukte

Zur Untersuchung des Einflusses der Eduktverhältnisse HES und HEMA-CI zueinander werden Reaktionsansätze miteinander verglichen, die sich nur in diesem Merkmal unterscheiden. Die übrigen Parameter wie das Verhältnis von Dimethylaminopyridin (DMAP) zu Hydroxyethylmethacrylatcarbonylimidazol (HEMA-CI) und auch der HEMA-CI-Ansatz als Eduktquelle wurden gleich gehalten. Die DS-Werte zweier Reaktionsansätze gegenüber der Reaktionsdauer sind in Abb. 18 zusammen aufgetragen.

Der DS nimmt von 24 h bis 100 h mit annähernd gleicher Steigung in beiden Fällen zu, durchläuft bei 100 Stunden ein Maximum und nimmt in den darauf folgenden 20 Stunden wieder ab. Der Reaktionsverlauf ist nahezu identisch. Zudem ist der DS, wie erwartet, umso größer, je höher die eingesetzte HEMA-CI-Konzentration ist.

Neben dem Substitutionsgrad der Proben ist zur Charakterisierung auch das Molekulargewicht, bzw. die Molekulargewichtsverteilung der modifizierten Polymere von Interesse. Dieses lässt sich mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmen, in der Polymere auf Grund ihres unterschiedlichen hydrodynamischen Volumens aufgetrennt werden.

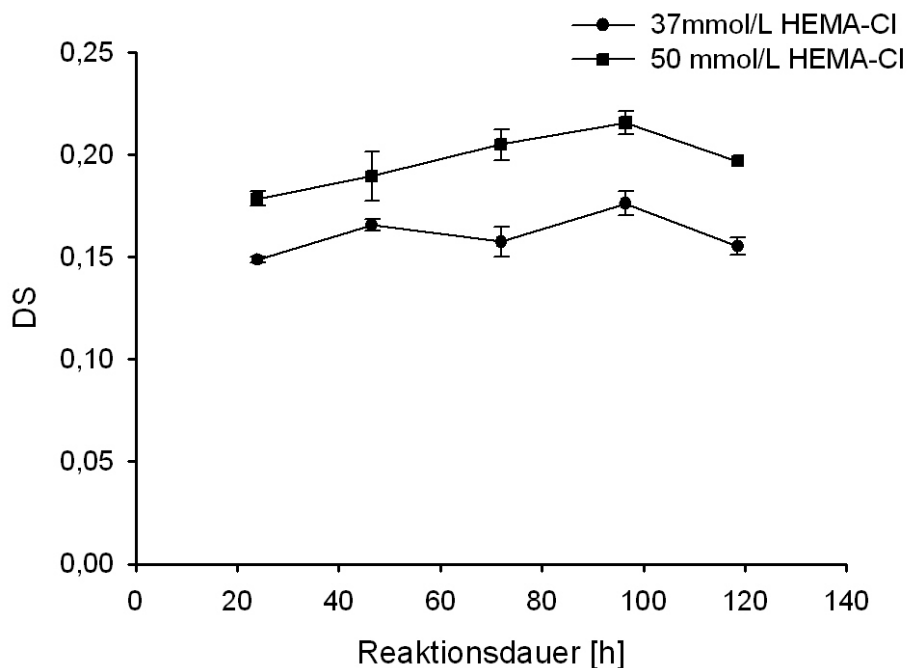


Abb. 18: Variation von [HEMACI] bei konstanter [HES] (100mmol/L) bei DMAP/HEMA-CI (mol/mol) = 1,55, RT und identischem HEMA-CI; Substitutionsgrade vs. Reaktionsdauer

Proben mit bekanntem DS wurden in der GPC gemessen¹⁴¹. Zum Vergleich dient eine HES-Probe, welche unter gleichen Bedingungen wie die HESHEMA-Derivate behandelt wurde, d.h. mit der entsprechenden Menge an DMAP über mehrere Tage unter Stickstoff bei Raumtemperatur in DMSO gerührt. Die Elutionsprofile aus der GPC (Abb. 19) dieser drei Polymere unterscheiden sich allerdings deutlicher als die NMR-Ergebnisse. Die in diesem Vergleich verwendeten HESHEMA Proben zeigten nur geringe Löslichkeiten in Wasser, so dass teilweise nur filtrierte Proben verwendet werden konnten. Dies verringert die Aussagekraft der Messergebnisse über das komplette Polymer HESHEMA, da nur der lösliche Teil gemessen wird.

Im Lichtstreuendetektor zeigt die Referenz HES ein intensives Signal mit einer engen Verteilung zwischen 15 und 20 mL mit einem Maximum bei 17 mL. Die Probe mit einem HES/HEMA-CI Verhältnis von 100/37 zeigt ein breiteres Signal, welches bei 13 mL stark ansteigt, sein Maximum bei 15 mL hat, dann eine geringe Schulter bei 17 mL zeigt und von dort an abnimmt und nach 22 mL beendet ist. Das blaue Signal der Probe mit dem größeren HEMA-CI-Anteil ist 1/5 so intensiv wie das Signal der HES-Probe, beginnt erst nach 16 mL, hat sein Maximum bei 17,5 mL und nimmt mit starkem Tailing bis zu 25 mL ab. Das Signal des Brechungsindexdetektors zeigt für HES einen nahezu symmetrischen Peak, der zwischen 16 und 21 mL liegt und dessen Maximum bei 17,5 mL liegt. Das RI-Signal der 37 mmol/L Probe

ist halb so intensiv wie das der Referenz, beginnt bei 15 mL, zeigt eine kleine Schulter bei 16 mL, steigt auf ein Maximum bei 18,5 mL und nimmt mit Tailing bis auf 25 mL ab.

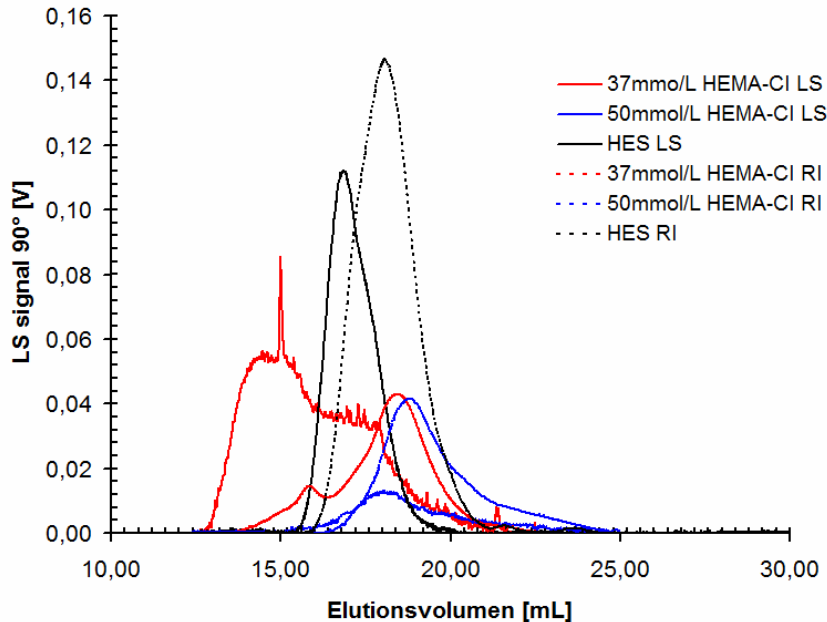


Abb. 19: GPC-Elutionsprofile (- = LS, Signal vom Lichtstreuendetektor; - - = RI, Signal vom Brechungsindexdetektor) der HESHEMA-Proben mit unterschiedlicher HEMA-CI-Konzentration (37 mmol/L HEMA-CI/100 mmol/L HES(-); 50 mmol/L HEMA-CI/100 mmol/L HES (-) bei der Herstellung und reine HES (-) als Vergleich

Das blaue Signal im Brechungsindexdetektor für die Probe mit dem höheren HEMA-CI-Gehalt von 50 mmol/L hat eine Signalthöhe, die nur ein Drittel der Höhe der Referenz beträgt. Es beginnt bei 16 mL, durchläuft sein Maximum bei 18,5 mL und nimmt mit starkem Tailing ab, bis es bei 27 mL gegen Null geht.

Aus dem Vergleich dieser GPC-Profile ergeben sich folgende Beobachtungen:

- Die Signale der Proben im Brechungsindexdetektor sind sehr gering, es werden nur 40 % bzw. 16 % der eingewogenen Masse wiedergefunden, da durch das Filtrieren der Proben vor der GPC-Messung viel Probenmaterial abgetrennt wird. Es wird daher nur der in Wasser lösliche Teil betrachtet.
- Der lösliche Teil der Probe mit dem HEMA-CI/HES-Verhältnis von 37/100 (rot) weist eine bimodale Verteilung mit einer Schulter bei kürzeren Elutionszeiten auf. Beim Einbeziehen dieses Peaks in die Molekulargewichtsbestimmung werden somit höhere Molekulargewichte als die Vergleichsprobe HES erhalten. Der Hauptpeak dieser

Verteilungsfunktion zeigt allerdings ein zu höheren Elutionszeiten gering verschobenes Maximum im Vergleich zu HES.

- Der lösliche Teil der Probe mit dem HEMA-CI/HES-Verhältnis von 50/100 (blau) ist eine monomodale Verteilung mit einem Tailing, was auf Oligomere hindeutet. Zudem ist das Maximum dieses Peaks gegenüber der HES-Referenz ein wenig stärker zu höheren Elutionszeiten verschoben als die Probe mit dem HEMA-CI/HES-Verhältnis von 37/100 (rot)

Diese Elutionsprofile lassen sich über die Signale des Lichtstreuendetektors auswerten. Anhand dieser ist es möglich, das Gewichtsmittel \overline{M}_w zu bestimmen, um die Reaktionsansätze auch quantitativ zu vergleichen. Da die Signale verglichen mit der HES-Referenz deutlich schwächer sind, ist der Fehler der Gewichtsmittelbestimmung größer. Für diese Bestimmung müssen die Brechungsindexinkremente (dn/dc), die Änderung des Brechungsindex n mit Änderung der Konzentration c , bekannt bzw. vorgegeben sein. Da die Polymere alle auf HES basieren, wurde für alle Proben derselbe dn/dc Literaturwert für HES von $0,146 \text{ mL/g}^{20}$ verwendet. Über die Reaktionsdauer lassen sich die \overline{M}_w -Werte auftragen, die für alle Proben über den Lichtstreuendetektor bestimmt wurden (Abb. 20). Alle Proben wurden mehrmals gemessen, so dass die Werte in Abb. 20 Mittelwerte der Messungen mit dem Mittelwert des jeweiligen Fehlers des Lichtstreuendetektors als Fehlerbalken wiedergeben. Neben den Gewichtsmittel (\overline{M}_w [g/mol], gefüllte Symbole) sind die Substitutionsgrade (DS, leere Symbole) in Abb. 20 wiedergegeben.

Es ergeben sich somit folgende Ergebnisse:

- Als vergleichender Standard sind die Gewichtsmittel der reinen HES-Proben aufgetragen, die schon in Abb. 19 als Referenz fungieren. Diese zeigen über die komplette Reaktionsdauer nahezu keine Änderung des Gewichtsmittels, da der \overline{M}_w -Wert nach 26 Stunden Reaktionsdauer 107000 g/mol mit einem Fehler von 4 % beträgt und dieser nach 120 Stunden einen Wert von 112000 g/mol mit einem Fehler von 5 % aufweist, was die Konstanz des Gewichtsmittel innerhalb des Fehlers belegt.
- Das Gewichtsmittel für den HESHEMA-Ansatz mit dem HEMA-CI/HES-Verhältnis von 37/100 beträgt nach 24 h ca. $420000 \text{ g/mol} \pm 10 \%$, nach 46,5 h ca. $220000 \text{ g/mol} \pm 18 \%$ und nach 96,5 h $175000 \text{ g/mol} \pm 15 \%$. Das Gewichtsmittel des löslichen Anteils dieser Probe sinkt somit mit zunehmender Reaktionszeit. Zudem zeigen die GPC-Ergebnisse bimodale Verteilungen mit hochmolekularen Nebenfraktionen.

- Das Gewichtsmittel für den HESHEMA-Ansatz mit 50 mmol/100 mmol HES beträgt nach 24 h ca. 66000 g/mol und verändert sich mit zunehmender Reaktionsdauer nicht, da die \overline{M}_w -Werte nach 96,5 Stunden 77000 g/mol \pm 10% und nach 118,5 Stunden 72000 g/mol \pm 43% betragen. Somit liegen diese Werte unter den Gewichtsmittelwerten des Vergleichsstandards, die nahezu konstant bei ca. 110000 g/mol liegen.

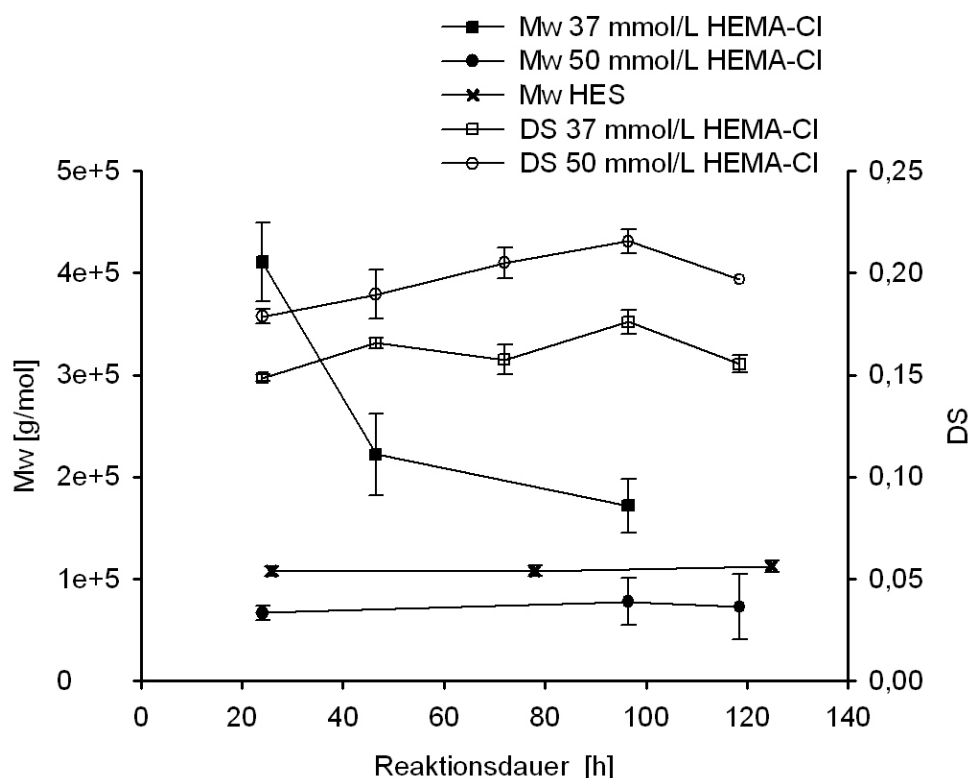


Abb. 20: Variation von [HEMA-CI] bei konstanter [HES] (100 mmol/L) bei DMAP/HEMA-CI (mol/mol) = 1,55, RT und identischem HEMA-CI – mittleres Gewichtsmittel (\overline{M}_w) [g/mol] (■●) bzw. Substitutionsgrad (DS) (□○) über die Reaktionsdauer [h]

Diese GPC-Messungen zeigen nicht die erwarteten \overline{M}_w -Verläufe. Da die GPC-Messungen in Wasser mit 0,001 wt.% Natriumazid als Elutionsmittel aufgenommen wurden und die HESHEMA-Herstellung in einem Gemisch aus Dimethylformamid/Dimethylsulfoxid 6/1 v/v als Lösungsmittel, können schlecht lösliche Proben an dem Säulenmaterial adsorbieren. Während der Messung gab es keinen Druckanstieg in der GPC-Anlage, was somit gegen eine Adsorption spricht. Die geringen Wiederfindungsraten von 50-80 % weisen aber auf einen gewissen Verlust durch Wechselwirkungen am Säulenmaterial hin. Die erhaltenen Messwerte deuten neben diesen messbedingten Abweichungen daher auf Nebenreaktionen hin. Würde

die polymeranaloge Umsetzung von HES mit HEMA-CI ohne Nebenreaktionen verlaufen, würde das Molekulargewicht mit dem DS ansteigen. Dies ist bei diesen Proben nicht der Fall, was somit auf Nebenreaktionen oder auch Abbaureaktionen hindeutet.

Es wurde daher der Einfluss der einzelnen Komponenten der Reaktion auf das Molekulargewicht näher untersucht, indem ein kombinatorischer Versuch durchgeführt wurde. Dazu wurde eine Stammlösung von HES mit DMAP in einem Verhältnis von 4:1 in einem Dimethylformamid/Dimethylsulfoxid 6/1 v/v Gemisch vorgelegt. Diese Stammlösung wurde in drei gleiche Teile aufgeteilt. In die Teillösung A wurde das bei der HESHEMA-Herstellung entstehende Nebenprodukt Imidazol zugegeben. In B wurde das bei der HESHEMA-Herstellung als Verunreinigung des HEMA-CI noch vorhandene HEMA zugegeben. Der Lösung C wurde das bei der HEMA-CI-Herstellung als Inhibitor der Vernetzungspolymerisation zugesetzte Paracresol zugegeben. Diese Teillösungen wurden wiederum in drei Teile geteilt und teilweise kombiniert, so dass sich Lösungen mit folgenden Verhältnissen ergaben (Tab. 1):

Tab. 1: Kombinationsversuch Molekulargewichtsbeeinflussung: Molare Verhältnisse der Edukte

Probe	HES	DMAP	Imidazol	HEMA	Paracresol
A	4	1	3	-	-
B	4	1	-	3	-
C	4	1	-	-	3
AB	4	1	1,5	1,5	-
AC	4	1	1,5	-	1,5
BC	4	1	-	1,5	1,5
ABC	4	1	1	1	1

Diese sieben Reaktionsansätze wurden analog zur HESHEMA-Herstellung behandelt. Es wurden von jedem Ansatz Proben nach 24 (Probe 1), 52 (Probe 2) und 101 h (Probe 3) entnommen, die dialysiert wurden. Bei den Proben, die Paracresol enthalten, fällt nach Wasserzugabe im Dialyseschlauch ein weißer Feststoff aus. NMR-Untersuchungen dieses Niederschlags zeigen, dass es sich dabei um reines Paracresol handelt. Die Proben wurden daher filtriert und gefriergetrocknet. Von diesen Proben wurden ebenfalls GPC-Chromatogramme mit Wasser mit 0,001 wt.% Natriumazid als Elutionsmittel aufgenommen. Da bei den Messungen keine Druckanstiege in der GPC-Anlage beobachtet wurden und auch die Massenwiederfindung Werte im Bereich von 100 % liefert, kann die Adsorption von

schlechter löslichen Polymeren auf dem Säulenmaterial ausgeschlossen werden. Die Elutionsprofile der unterschiedlichen Proben nach 101 h sind in Abb. 21 wiedergegeben.

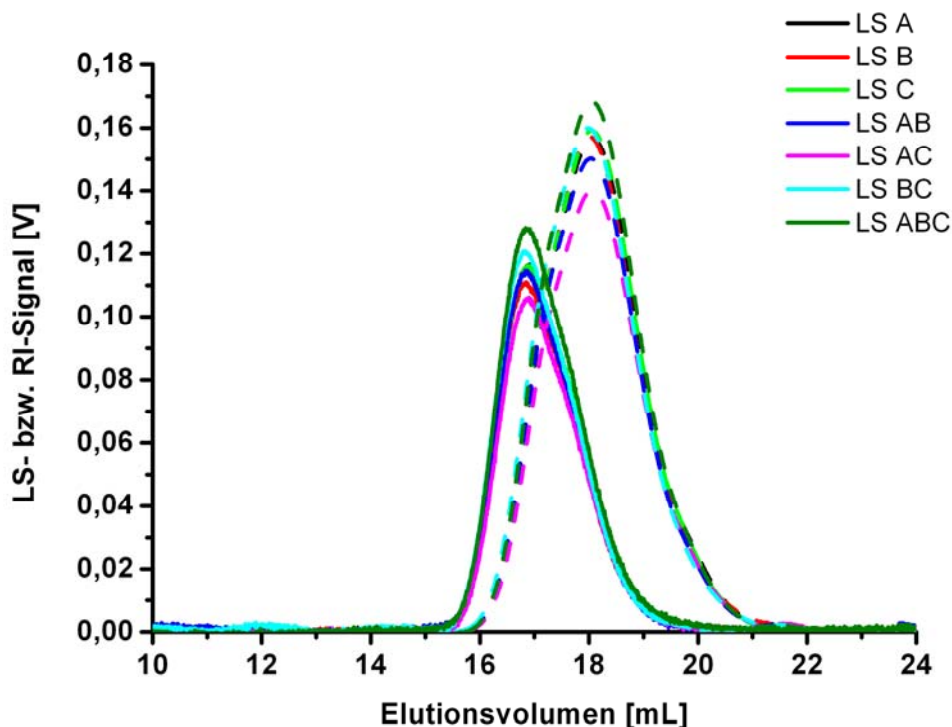


Abb. 21: GPC-Chromatogramme des Kombinationsversuchs; Lichtstreuendetektor-(LS)-Signal (durchgängige Linien) bzw. RI-Signal (gestrichelte Linien, nicht in Legende wiedergegeben, gleiche Farbe wie beim LS-Signal) der verschiedenen Kombinationen der Edukte (Abkürzungen siehe Tab. 1) vs. Elutionsvolumen nach 101 h

Es zeigen sich nach 101 h, wie auch bei den Proben nach 24 h und 52 h, keine Unterschiede im Vergleich der Elutionsprofile der verschiedenen Proben. Als entsprechende Einflussgrößen auf das Molekulargewicht lassen sich somit Imidazol, HEMA und Paracresol ausschließen. Somit ergibt sich als entscheidende Größe für den DS und das Molekulargewicht von HESHEMA das Verhältnis von HEMA-CI und DMAP.

Es lässt sich daher das Fazit ziehen, dass bei gleichen Randbedingungen durch Erhöhung des HEMA-CI-Gehaltes in der Reaktionslösung mit dem Gemisch Dimethylformamid / Dimethylsulfoxid 6/1 v/v als Lösungsmittel HESHEMA-Derivate mit höherem DS erhalten werden können. Die HESHEMA-Proben, die erhalten werden, sind teilweise nicht komplett löslich, was sich durch die Abnahme der Wasserlöslichkeit mit zunehmenden DS oder Nebenreaktion erklären lässt.

Die löslichen Teile der HESHEMA-Proben zeigen teilweise kleinere hydrodynamische Volumina als die HES-Referenz, was auf Nebenreaktionen und teilweisen Abbau des Polymerrückgrates hindeutet. Als Einflussgrößen auf das hydrodynamische Volumen der Proben lassen sich Nebenprodukte und Verunreinigungen des HEMA-CI wie Imidazol, HEMA und Paracresol ausschließen. Eine weitere mögliche Verunreinigung des HEMACI-Edukts, Carbonyldiimidazol, wurde nicht getestet, da dieses durch die beiden Imidazolseitengruppen als bifunktioneller Vernetzer zwischen Hydroxyfunktionen reagieren kann^{142, 143}. Daher lässt sich somit, neben dem HEMA-CI, DMAP als Einflussgröße auf das Molekulargewicht ausmachen, was im folgenden Kapitel 3.2.3 näher behandelt werden soll.

3.2.3 Einflussgrößen auf HESHEMA: DMAP Konzentration

Um den Einfluss des DMAP zu untersuchen wurden Probenreihen mit unterschiedlichen DMAP-Gehalten mittels NMR-Spektroskopie und Gelpermeatationschromatographie untersucht.

3.2.3.1 Einfluss von DMAP auf den DS

In Kapitel 3.2.2 wurde gezeigt, dass das Verhältnis der Edukte HES zu HEMA-CI Einfluss auf den DS nimmt. Daher wurden zur Untersuchung des Einflusses des DMAP-Gehalts auf den DS der HESHEMA-Proben im Weiteren Reaktionsansätze miteinander verglichen, die annähernd das gleiche Verhältnis von HEMA-CI/HES aufweisen. Es ergeben sich Datensätze für die Eduktverhältnisse HES/HEMA-CI von 100/33, 100/40 und 100/55. An diesen lässt sich durch Variation des DMAP-Gehalts der Einfluss von DMAP auf die Substitution von HES mit HEMA-CI untersuchen.

Bei einer Konzentration von 33 mol/L HEMA-CI bei 100 mol/L HES ergeben sich bei der Variation des Verhältnisses DMAP/HEMA-CI von 0 über 1 auf 1,34 folgende Verläufe der Substitutionsgrade (Abb. 22):

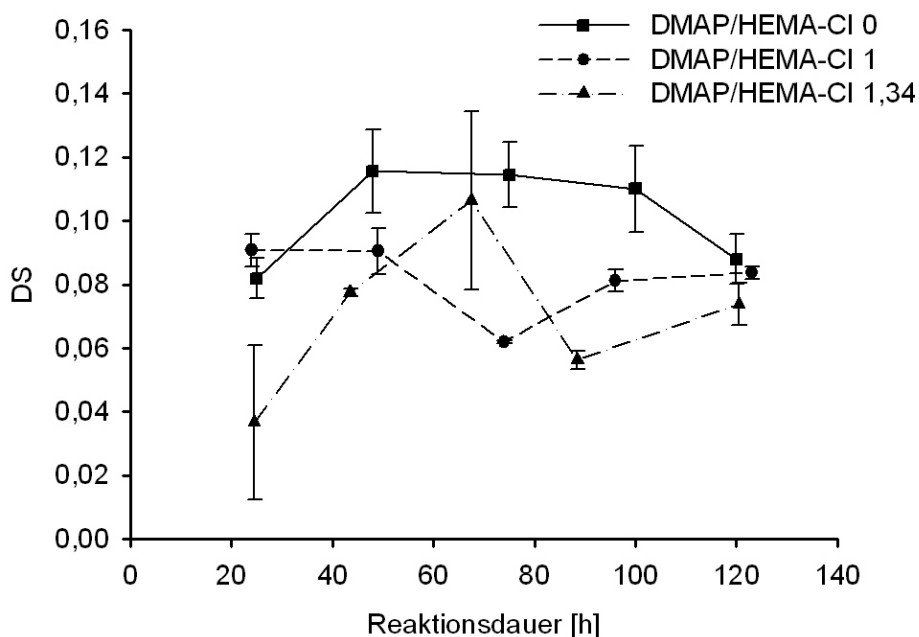


Abb. 22: DS als Funktion der Reaktionsdauer bei Variation des DMAP/HEMA-CI Verhältnisses (0; 1; 1,34) bei konst. [HEMA-CI] zu [HES] Verhältnis (33/100 mol/L), RT

Der Verlauf der DS-Werte über die Reaktionsdauer verläuft für alle drei Ansätze unterschiedlich. Der Ansatz ohne DMAP Zugabe erreicht sein Maximum nach 48 h. In der Zeit bis zu 100 h ist ein Plateauwert von 0,11 gegeben mit einer geringen Abnahme. Bei 120 h ist der DS-Wert fast wieder auf dem gleichen Niveau wie der DS nach 24h. Die DS-Werte für den Ansatz mit dem DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1 nehmen mit der Zeit von 0,09 bei 24 h, mit einer Schwankung bei 74 h, leicht auf 0,085 bei 123 h ab. Die DS Werte für den Reaktionsansatz mit einem DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,34 erreichen nach 68 h ein Maximum und fallen nach 120 h auf einen DS von 0,7. Diese unterschiedlichen Reaktionsverläufe lassen sich mit den unterschiedlichen HEMA-CI Qualitäten begründen. HEMA-CI ist ein sehr reaktives Edukt und ein vollständiges Abtrennen des Herstellungslösungsmittels ist nicht möglich, da sonst eine Autopolymerisation erfolgt. Es lässt sich daher nicht immer in der gleichen Qualität und Konzentration herstellen. Dies scheint der Hauptgrund für die unterschiedlichen Reaktionsverläufe zu sein.

Unter Nichtbeachtung der abweichenden Werte bei 74 h für den Ansatz mit dem Verhältnis DMAP/HEMA-CI gleich 1 und bei 68 h für den Ansatz mit dem Verhältnis DMAP/HEMA-CI gleich 1,34 lassen sich zwei Trends im Vergleich dieser Reaktionsverläufe erkennen. Zum einen durchlaufen alle Ansätze ein Maximum. Zum anderen nimmt der DS bei gleicher Reaktionsdauer mit zunehmendem DMAP Gehalt ab.

Dies lässt sich auch in anderen Reaktionsansätzen beobachten.

Bei einer Konzentration von ca. 40 mol/L HEMA-CI zu 100 mol/L HES und der Variation des DMAP/HEMA-CI Verhältnisses von 1,55 über 1,6 bis 1,66 ergeben sich über die Reaktionsdauer folgende DS-Werte (Abb. 23).

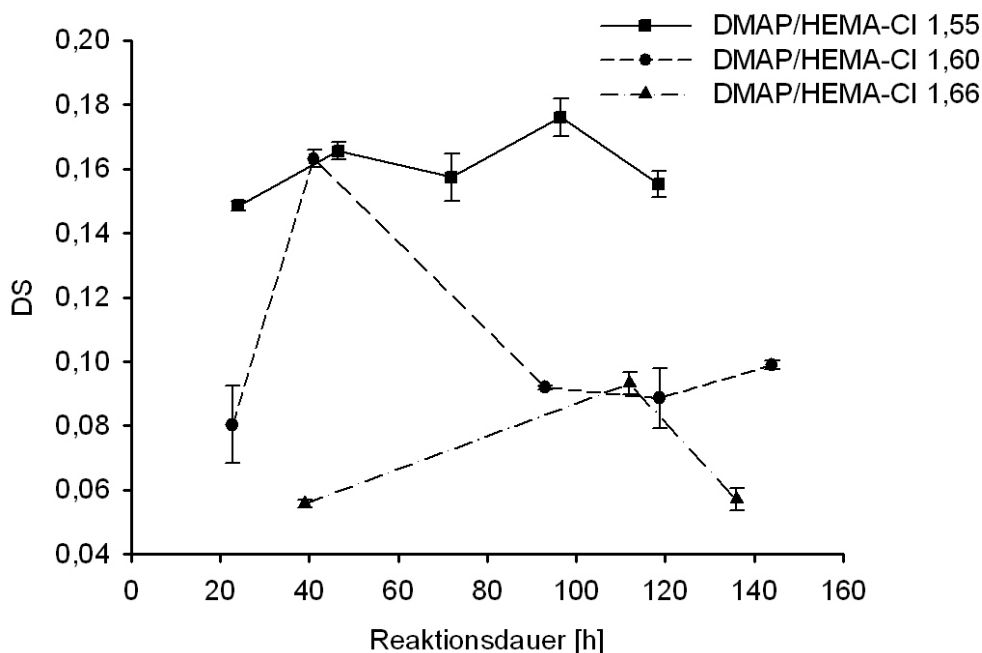


Abb. 23: DS als Funktion der Reaktionsdauer bei Variation des DMAP/HEMA-CI Verhältnisses (1,55; 1,6; 1,66) bei konst. [HEMA-CI] zu [HES] Verhältnis (40/100 mol/L), RT

In dem Reaktionsansatz mit dem DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,55 nimmt der DS von 0,15 nach 24 h bis zu einem Maximum von 0,17 nach 96 h zu und sinkt dann auf 0,155 nach 120 h. In dem Ansatz mit dem DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,6 steigt der DS von 0,08 nach 24 h stark an auf 0,16 nach 40 h und pendelt sich daraufhin um 0,09 ein. Die DS-Werte des dritten Ansatzes mit dem DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,66 nehmen dagegen von 0,06 nach 40 h bis auf 0,05 nach 140 h ab.

Diese unterschiedlichen Reaktionsverläufe lassen sich, wie bei den Reaktionsansätzen zuvor, wiederum mit den unterschiedlichen HEMACI-Quellen begründen. Zudem lässt sich derselbe Trend wie vorher (vgl. Abb. 22) feststellen; der DS nimmt mit zunehmender DMAP Konzentration ab.

Auch bei noch höheren Konzentrationen an HEMA-CI ist dieser Trend sichtbar. Dazu lassen sich die DS-Werte von Reaktionsansätzen vergleichen, deren Verhältnis von HEMA-CI zu HES 50 mol/l zu 100 mol/L beträgt und deren DMAP/HEMA-CI Verhältnis zwischen 1,55, 1,61 und 1,66 variiert (Abb. 24). Die DS-Werte der HESHEMA-Proben aus dem

Reaktionsansatz mit einem DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,55 nehmen von 0,17 nach 24 h stetig bis zu einem Maximum von 0,21 nach 96 h zu. In den darauf folgenden 24h nimmt der DS wieder ab auf 0,19.

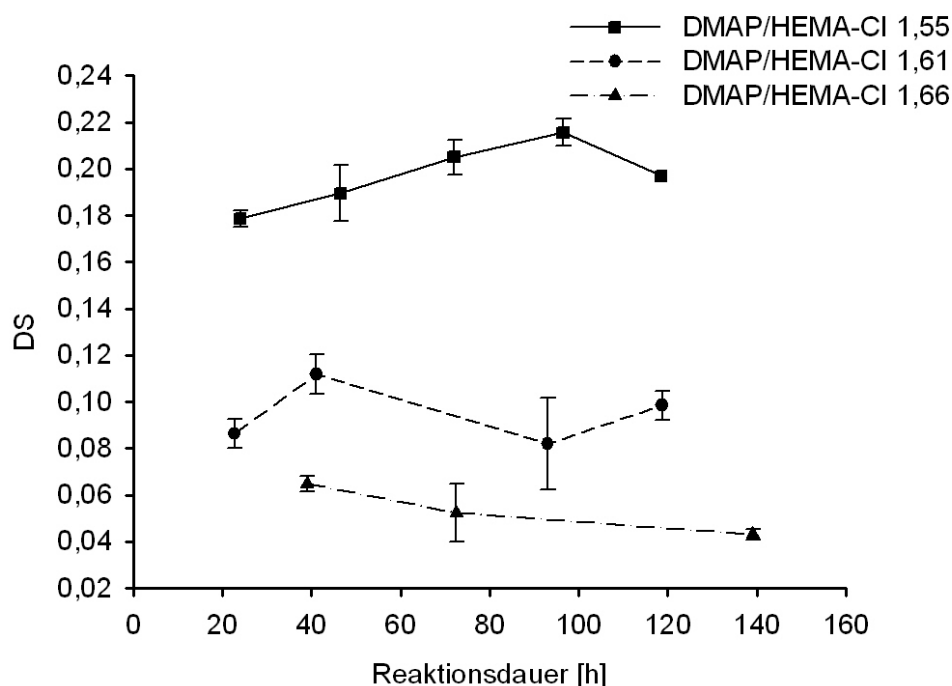


Abb. 24: DS als Funktion der Reaktionsdauer bei Variation des DMAP/HEMA-CI Verhältnisses (1,55; 1,6; 1,66) bei konst. [HEMA-CI] zu [HES] Verhältnis (50/100 mol/L), RT

Die HESHEMA-Proben aus dem Reaktionsansatz mit einem etwas höheren DMAP/HEMA-CI Verhältnis (1,61) weisen DS-Werte auf, die von 0,09 nach 24 h auf 0,11 nach 41 h zunehmen und mit längerer Reaktionsdauer wieder abnehmen. Die DS-Werte der HESHEMA-Proben mit dem höchsten DMAP/HEMA-CI Verhältnis (1,66) sinken von 0,06 nach 39h auf 0,04 nach 139 h ab.

Auch hier lassen sich die Trends feststellen, die auch bei geringeren HEMA-CI/HES Verhältnissen auftreten. Der DS der HESHEMA-Proben eines Reaktionsansatzes durchläuft ein Maximum. Die DS-Werte der unterschiedlichen Reaktionsansätze nehmen mit zunehmendem DMAP/HEMA-CI Verhältnis, also mit zunehmender DMAP-Konzentration ab.

3.2.3.2 Einfluss von DMAP auf das Molekulargewicht

Um den Einfluss von DMAP näher zu untersuchen, werden im Folgenden auch GPC-Ergebnisse in die Betrachtungen mit einbezogen. Dabei werden drei Reaktionsansätze miteinander verglichen, an denen eine DS-Bestimmung anhand NMR vorab erfolgte und deren GPC-Ergebnisse aussagekräftig sind, d. h. deren Massenwiederfindung bei 80-100 % liegt. Bei diesem Vergleich variiert das DMAP/HEMA-CI Verhältnis der Proben, das zwischen 1,5, 1,34 und 1 liegt. Von den schon vorgestellten Proben sind mehr Datensätze vorhanden, allerdings sind dabei die Massenwiederfindungsraten sehr gering (kleiner als 50 %), da diese Proben filtriert werden mussten, um auf die GPC-Säulen gegeben werden zu können, und damit nur bedingt aussagekräftig sind. Es werden daher nur drei Datensätze miteinander verglichen.

Die NMR-Ergebnisse ergeben für die verwendeten Proben folgenden zeitlichen Verlauf für den DS (Abb. 25):

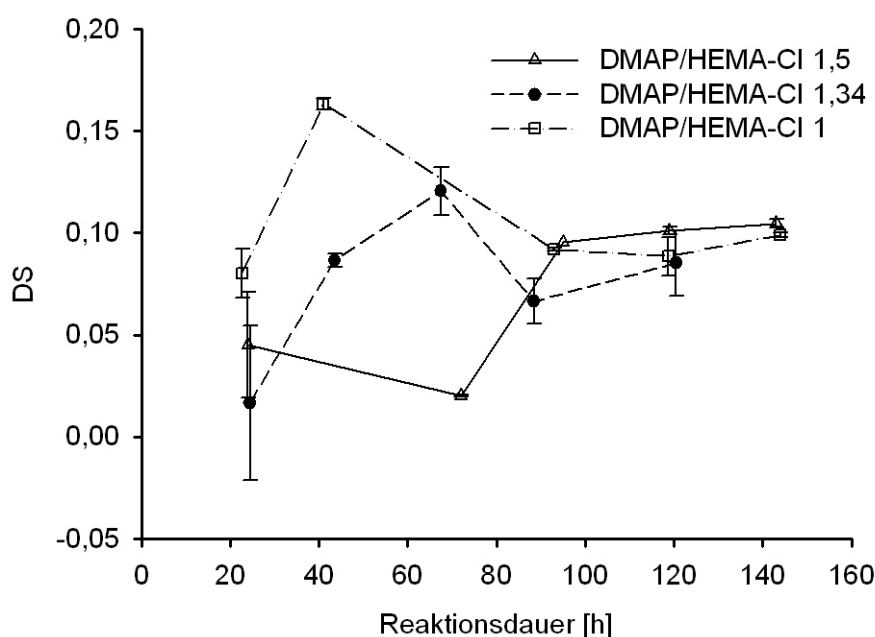


Abb. 25: DS als Funktion der Reaktionsdauer bei Variation des DMAP/HEMA-CI Verhältnisses ($\square = 1$; $\bullet = 1,34$; $\triangle = 1,5$) bei konst. [HEMA-CI] zu [HES] Verhältnis (25/100 mol/L), RT

Die HESHEMA-Proben aus dem Reaktionsansatz mit einem DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,5 weisen nach 24 h einen DS von 0,04 auf, allerdings mit einem sehr großen Fehler. Nach 72,5 h hat der DS ein Minimum von 0,02 erreicht. In den darauf folgenden Stunden steigt der DS auf einen Wert von 0,1 nach 95 h, der sich auch mit zunehmender Reaktionszeit

nicht ändert. Die DS-Werte für die HESHEMA-Proben aus dem Reaktionsansatz mit einem DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,34 erreichen nach einem Wert von 0,01 nach 24 h nach 68 h ein Maximum mit einem DS von 0,16 und fallen nach 120 h auf einen DS von 0,1 ab.

Die HESHEMA-Polymere aus dem Reaktionsansatz mit dem geringsten DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1 weisen nach 24 h einen DS von 0,08 auf. Die DS-Werte steigen auf einen maximalen DS von 0,16 nach 41 h an und fallen mit zunehmender Reaktionsdauer auf einen DS-Wert von 0,1 nach 70 h bis 0,09 nach 118 h.

Bei diesen Reaktionsansätzen zeigt sich die schon beschriebenen Beobachtungen, zum einen unterscheiden sich die DS-Werte über die Reaktionsdauer in ihren Verläufen, was sich mit den unterschiedlichen HEMA-CI-Qualitäten und der Reaktivität von HEMA-CI begründen lässt. Zum anderen zeigt sich, je höher das DMAP/HEMA-CI Verhältnis ist, umso geringere DS-Werte werden nach 40 h erhalten. Es zeigt sich allerdings, dass sich die DS-Werte bei 0,1 einpendeln, wie es auch schon bei den Proben festgestellt wurde, die in Abb. 22 vorgestellt worden sind.

Die \overline{M}_w -Werte der HESHEMA-Proben weisen über die Reaktionsdauer allerdings ähnliche Verläufe auf (Abb. 26). In dieser Auftragung ist wie in Abb. 19 eine HES-Probe als Vergleich angeführt, die unter gleichen Bedingungen wie die HESHEMA-Proben behandelt wurde. Diese zeigt über die Zeit nur geringe Änderungen des \overline{M}_w -Wertes von 110000 g/mol. Die \overline{M}_w -Werte der HESHEMA-Ansätze steigen nach 24 h von 105000 g/mol auf ein Maximum von 170000 g/mol nach ca. 72 h an. Daraufhin fallen in allen der drei Ansätze die \overline{M}_w -Werte wieder ab auf ca. 130000 g/mol bei 95 h, um danach wieder auf ca. 160000 g/mol nach 120 h zu steigen. Die Probe aus dem Reaktionsansatz mit einem DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,5 erreicht nach 143 h einen \overline{M}_w -Wert von 250000 g/mol

Es ergeben sich somit drei Phasen des Molekulargewichts:

- Von 24 h bis 72 h steigen die Molekulargewichte in den Proben. Dabei lässt sich keine direkte Abhängigkeit von dem DMAP-Gehalt ausmachen, da sich die Messungenauigkeiten der Messpunkte überlappen.
- Nach Durchschreiten des lokalen Maximums bei 72 h nehmen die Molekulargewichte ab. Das Durchlaufen eines Maximums deutet darauf hin, dass Nebenreaktionen ablaufen. Ein Abbau des Polymers ist möglich.
- Nach 95 h nehmen die Molekulargewichte wieder zu, was auf eine Kombination von teilweise abgebauten Polymeren hindeutet.

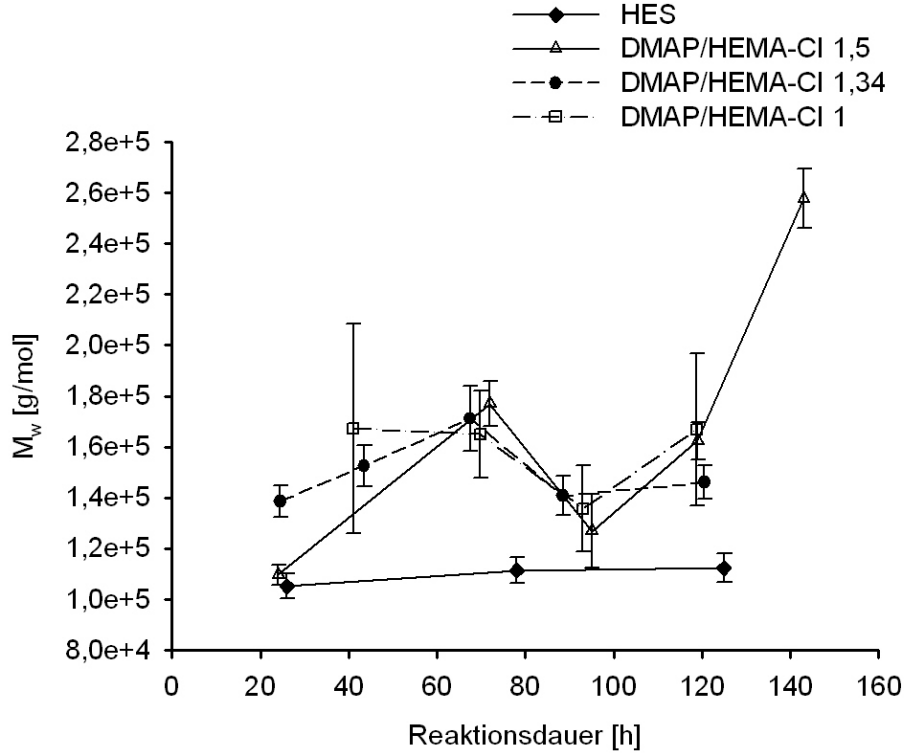


Abb. 26: Gewichtsmittel \overline{M}_w der HESHEMA-Proben als Funktion der Reaktionsdauer bei Variation des DMAP/HEMA-CI Verhältnis (1; 1,34; 1,5) bei konst. [HEMA-CI] zu [HES] Verhältnisses (25/100 mol/L) im Vergleich mit HES, RT

Um die Daten der GPC-Ergebnisse mit den NMR-Daten zu kombinieren, lässt sich das Gewichtsmittel \overline{M}_w mit dem Gewicht der Wiederholungseinheit M_{ru} , die durch den DS beeinflusst wird, in Beziehung setzen. Das Molekulargewicht der Wiederholungseinheit M_{ru} ist gegeben aus der Summe des Molekulargewichts der Wiederholungseinheit der HES M_{AGU} mit dem Produkt des DS mit der Differenz des Molekulargewichts des HEMACI-Substituenten M_{HEMACI} und eines Protons M_H :

$$M_{ru} = M_{AGU} + DS \cdot (M_{HEMACI} - M_H) \quad (39)$$

Die Division aus dem Gewichtsmittel \overline{M}_w und dem Molekulargewicht der Wiederholungseinheit M_{ru} wird als Polymerisationsgrad X_w bezeichnet¹⁴⁴.

$$X_w = \frac{\overline{M}_w}{M_{ru}} \quad (40)$$

Die Fehler des Polymerisationsgrades X_w ergibt sich nach Fehlerfortpflanzung mit dem Fehler $\overline{\Delta M_w}$ aus dem Lichtstreusignal und dem Fehler ΔM_{ru} aus der DS-Bestimmung zu:

$$\Delta X_w = \frac{\partial X_w}{\partial \overline{M_w}} \cdot \overline{\Delta M_w} + \frac{\partial X_w}{\partial M_{ru}} \cdot \Delta M_{ru} = \frac{1}{M_{ru}} \cdot \overline{\Delta M_w} - \frac{\overline{M_w}}{M_{ru}^2} \cdot \Delta M_{ru} \quad (41)$$

Somit ergeben sich für die Polymerisationsgrade der unterschiedlichen HESHEMA-Ansätze folgende Verläufe über die Zeit (Abb. 27):

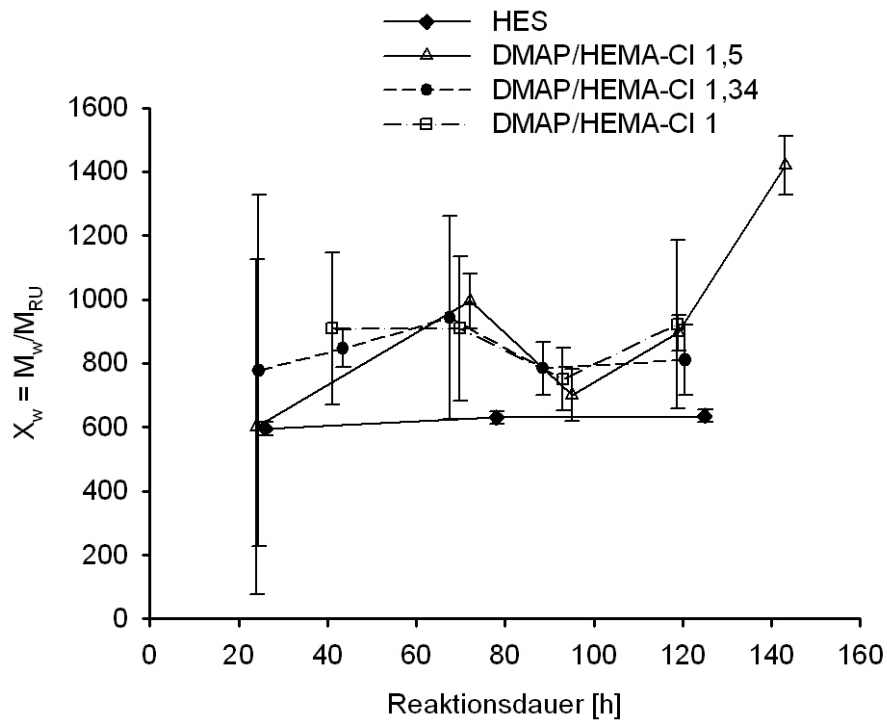


Abb. 27: Polymerisationsgrade X_w der unterschiedlichen HESHEMA-Ansätze als Funktion der Reaktionsdauer bei Variation des DMAP/HEMA-CI Verhältnisses (1; 1,34; 1,5) bei konst. [HEMA-CI] zu [HES] Verhältnis (25/100 mol/L) im Vergleich mit HES, RT

Die Verläufe der Polymerisationsgrade sind nahezu identisch mit denen der Gewichtsmittel aus den GPC-Untersuchungen, da das Molekulargewicht der Wiederholungseinheit M_{ru} nur zwischen 177 und 184 g/mol variiert und somit der Verlauf des Gewichtsmittels $\overline{M_w}$ über die Zeit maßgeblich auf den Polymerisationsgrad Einfluss nimmt. Durch die Fehlerfortpflanzung

kommt es allerdings zu großen Fehlerbalken. Es ergeben sich somit auch drei Phasen des Polymerisationsgrades:

- Von 24 h bis 72 h steigen die Polymerisationsgrade an.
- Nach Durchschreiten des lokalen Maximums bei 72 h werden die Polymerisationsgrade kleiner.
- Die Polymerisationsgrade nehmen nach 95 h wieder zu, was auf eine Kombination von teilweise abgebauten Polymeren hindeutet, auf die auch die schlechtere Löslichkeit der Proben hindeutet.

Durch die schlechtere Löslichkeit kann es zu Artefakten in der Molmassenbestimmung kommen. Die Polymere könnten nicht einzeln solubilisiert, sondern als Agglomerate vorliegen, was in größeren Molekulargewichten resultiert. Solche Artefakte lassen sich durch Variation der GPC-Messbedingungen wie Messtemperatur- oder Lösungsmitteländerungen mit unterschiedlichen Salzzusätzen oder aber auch mit Konzentrationsänderungen untersuchen. Diese Variationen wurden jedoch aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

Diese GPC-Untersuchungen und die Betrachtungen hinsichtlich des Polymerisationsgrades der HESHEMA-Proben, die mit unterschiedlichen HEMA-CI-Ansätzen hergestellt wurden, führen zu der Erkenntnis, dass es über den Reaktionszeitraum von 120 h bei Raumtemperatur drei Phasen gibt. Es lässt sich keine signifikante Abhängigkeit der HESHEMA-Eigenschaften durch die Variation der DMAP-Konzentration innerhalb der präsentierten Konzentrationsunterschiede feststellen.

In der ersten Phase (bis 72 h) vergrößern sich das Molekulargewicht und der Polymerisationsgrad. In der zweiten Phase (72-95 h) nehmen die \overline{M}_w -Werte und somit auch der Polymerisationsgrad ab. In der dritten Phase (95-144 h) nehmen die Werte wieder zu. In diesen zwei Phasen kehrt sich die Reihenfolge der Reaktionsansätze hinsichtlich der DMAP-Konzentration um, d.h. die Proben mit dem größeren DMAP-Gehalt zeigen die größeren \overline{M}_w -Werte und somit auch Polymerisationsgrade, allerdings sind die Fehler sehr groß, so dass diese Beobachtung an Aussagekraft verliert. Das Durchlaufen eines Maximums deutet darauf hin, dass Nebenreaktionen ablaufen.

Neben diesen dreiphasigen Reaktionsverläufen sind die Molekulargewichte auch sehr viel größer als die jeweils theoretisch berechneten Gewichtsmittel, welche auf Grund der geringen Substitutionsgrade nur im Bereich zwischen 108000 und 115000 g/mol liegen sollten.

Um den Einfluss von DMAP auf die Bildung von HESHEMA komplett auszuschließen, wurde ein Reaktionsansatz ohne DMAP-Zugabe angesetzt. Um auch die weiteren

verschiedenen Einflussgrößen wie den Inhibitor Paracresol ausschließen zu können, wurde der Substituent HEMA-Cl in Dimethylsulfoxid hergestellt. Zu diesem Rohprodukt wird HES, gelöst in der entsprechenden Menge Dimethylformamid, um das Verhältnis DMF/DMSO 6/1 v/v zu erhalten, gegeben. Die Proben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden, wurden analog zu den übrigen Ansätzen aufgearbeitet und vermessen. Dabei ergeben sich folgende Verläufe der DS- und \overline{M}_w -Werte (Abb. 28):

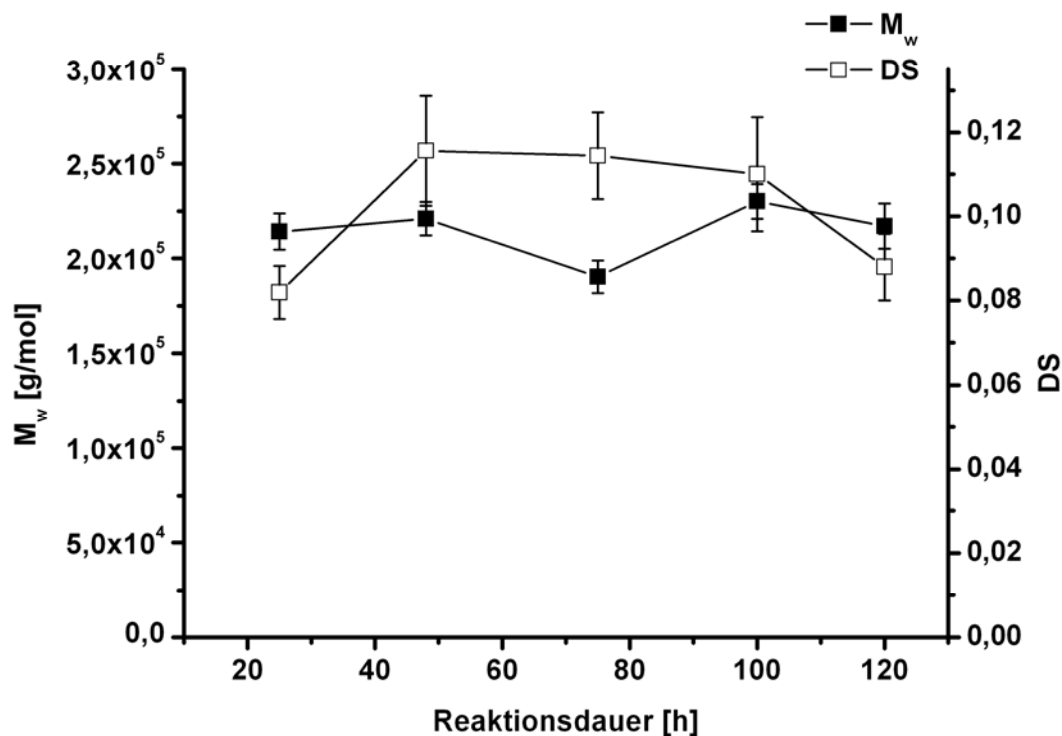


Abb. 28: HESHEMA ohne DMAP aus Rohedukt HEMA-Cl: DS-Werte (\square) und \overline{M}_w -Werte (\blacksquare) [g/mol] vs. Reaktionsdauer [h]

Der DS steigt von 0,09 nach 24 h auf 0,11 nach 48 h und sinkt in den darauf folgenden 52 h gering. Allerdings fällt der DS nach 100 h auf einen Wert von 0,09 nach 120 h. Die \overline{M}_w -Werte zeigen einen anderen Verlauf, nach 24 h beträgt der \overline{M}_w -Wert 214000 g/mol und steigt in den folgenden 24 h gering an auf 220000 g/mol. Danach sinkt der \overline{M}_w -Wert auf 190000 g/mol bei 75 h und steigt daraufhin wieder an auf 230000 g/mol nach 100 h. Nach 120 h ist der \overline{M}_w -Wert geringfügig kleiner mit 217000 g/mol. Bei diesen GPC-Ergebnissen liegt allerdings die Massenwiederfindung nur bei 50 bis 62 %, was die Aussagekraft schwächt.

Diese hohen Molekulargewichte lassen sich dadurch erklären, dass bei der HESHEMA-Herstellung dieser Probe auf die Aufreinigung des HEMACI verzichtet wurde, und HES zum Rohedukt HEMA-CI gegeben wurde. Da unreaktierte bzw. überschüssige Edukte der HEMA-CI-Herstellung dadurch noch vorhanden waren, kann es dabei zur Kopplung mehrerer HES-Polymerketten über deren Hydroxygruppen mit Spuren von nicht umgesetztem Carbonyldiimidazol gekommen sein.

Auffällig ist, dass es auch bei dieser Probe zu einem lokalen Minimum der \overline{M}_w -Werte kommt. Dieses ist im Vergleich zu den Proben mit DMAP-Zugabe allerdings zu späteren Reaktionszeiten verschoben, was sich auch in der Auftragung des Polymerisationsgrades gegen die Reaktionsdauer zeigt (Abb. 29):

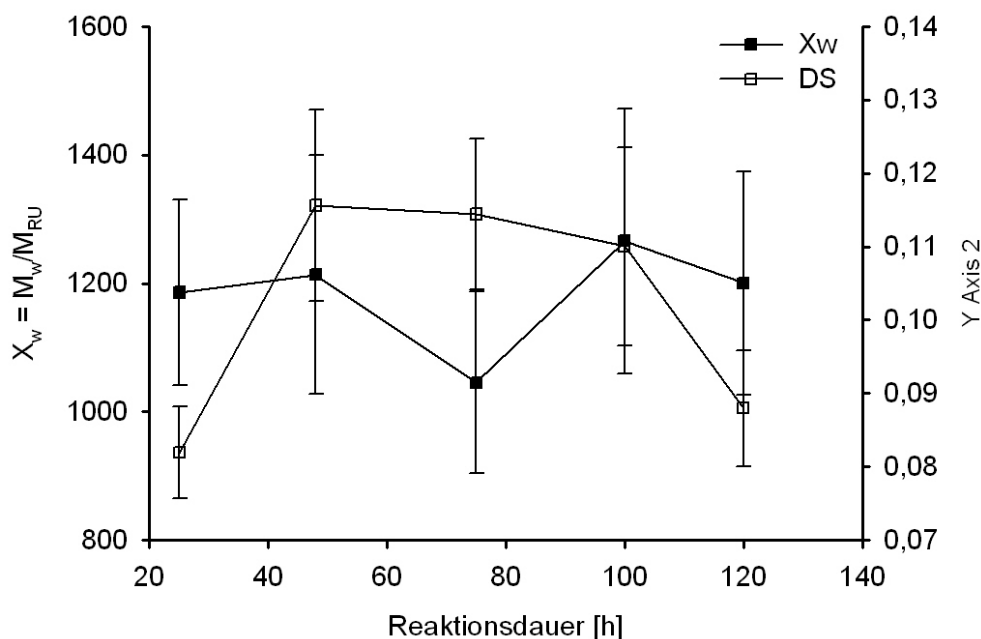


Abb. 29: Verlauf des Polymerisationsgrads X_w und des DS des HESHEMA-Ansatzes ohne DMAP-Zugabe über die Zeit

Die DMAP-Zugabe bewirkt also nicht den Durchlauf eines Minimums der \overline{M}_w -Werte, sie verzögert allerdings diesen um einige Stunden, da bei den Proben mit DMAP-Zugabe das Minimum erst nach 95 h erreicht ist.

Zusammenfassend lassen sich aus den Betrachtungen der GPC-Ergebnisse der Proben mit und ohne DMAP-Zugabe folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Das Molekulargewicht ist deutlich größer als das theoretisch aus den Substitutionsgrad berechnete, was auf Vernetzungen/Kombinationen von einzelnen Polymerketten hindeutet.
- Das Molekulargewicht nimmt über die Zeit nicht stetig zu.
- Proben mit DMAP-Zugabe zeigen einen dreiphasigen Verlauf des Molekulargewichts und somit auch des Polymerisationsgrades. Ein Minimum stellt sich bei etwa 95h ein. Signifikante Unterschiede aus den unterschiedlichen DMAP-Gehalten sind nicht zu beobachten, bzw. liegen innerhalb der Fehlergrenzen.
- Proben ohne DMAP-Zugabe weisen ein lokales Minimum bei 75h auf
- Die DMAP-Zugabe verzögert das Erreichen des Minimums.

Ein Reaktionsvorschlag, der diese Messergebnisse erklären könnte wird im folgenden Kapitel erläutert.

3.2.4 Reaktionsvorschlag

Um diese Verläufe der Polymerisationsgrade zu erklären, sollen neben den reinen \overline{M}_w -Werten auch die Form der GPC-Elutionsprofile betrachtet werden (Abb. 30). In dieser Auftragung sind in gestrichelten Linien die Signale des Brechungsindexdetektor (RI) wiedergegeben. Die durchgezogenen Linien resultieren aus den Signalen im Lichtstreuungsdetektor (LS), die im Folgenden näher diskutiert werden sollen, da dieser sensitiver für die Größe der zu messenden Moleküle ist¹⁴¹. Es fungiert dabei eine Elutionskurve der verwendeten HES (schwarz) als Referenz. Diese zeigt einen Peak mit einer kleinen Schulter bei höheren Elutionszeiten. Das Signal der Probe nach 25 h (rot) ist zu kürzeren Elutionszeiten verschoben und weist die gleiche Form auf wie die HES-Referenz. Bei der Probe nach 44 h (hellgrün) erfolgt ein weniger steiler Anstieg des Signals vor dem Signal der Probe nach 25 h (rot). Dies deutet auf hochmolekulare Polymere und Kombinationen von Polymerfragmenten hin. Die Probe nach 68 h (blau) weist diese Schulter bei niedrigen Elutionsvolumen noch ausgeprägter auf als die vorherige Probe. Der Peak der Probe nach 89 h (pink) weist nahezu die gleiche Form auf wie die Probe nach 24 h. Das Signal der Probe nach 120 h (dunkelgrün) ist zu höheren Elutionszeiten verschoben, weist allerdings auf der Peakseite der niederen Elutionszeiten die gleiche Form wie die Probe nach 24 h auf. Diese Probe zeigt allerdings ein ausgeprägtes Tailing zu höheren Elutionszeiten, was auf niedermolekulare Verbindungen hindeutet.

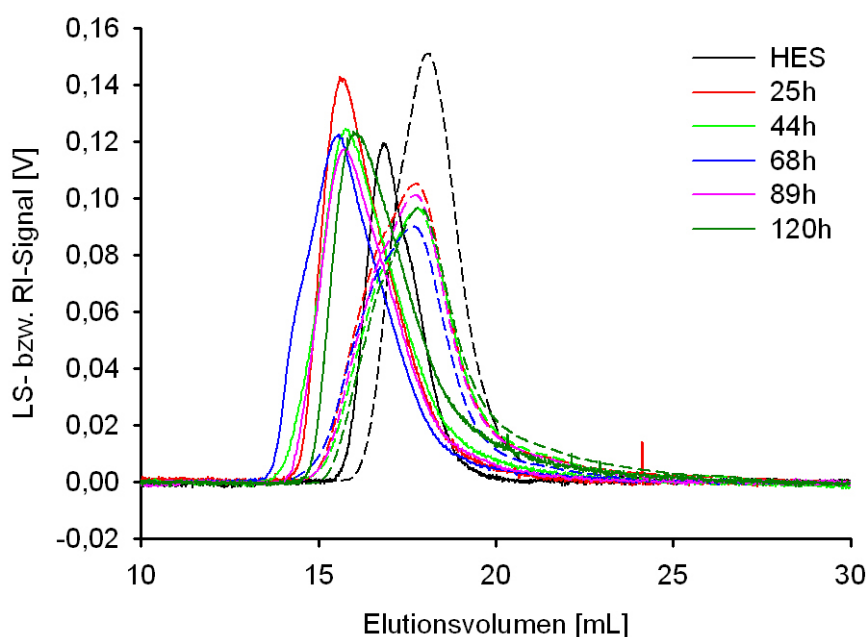


Abb. 30: GPC-Elutionsprofile der Proben nach verschiedenen Reaktionszeiten des HESHEMA-Ansatzes (DMAP/HEMA-CI Verhältnis 1,34, HEMA-CI/HES 25/100 mol/L) mit HES als Vergleich, (LS-Signal durchgezogene Linien, RI-Signal gestrichelte Linien)

Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgender Reaktionsvorschlag (Abb. 31) ableiten:

Es finden bei der HESHEMA-Herstellung drei Reaktionen statt.

Zum einen kommt es durch die Reaktion von HES- oder HESHEMA-Molekülen mit CDI-Resten zur Kopplung. Dabei wird Imidazol freigesetzt. Diese Reaktion würde den Anstieg des Molekulargewichtes erklären, welche deutlich höher sind als die theoretisch berechneten. Diese großen Moleküle sind wahrscheinlich zu einem geringen Anteil vorhanden, was die Schulter im hochmolekularen Bereich im Lichtstreusignal und den geringen Ausschlag im RI-Detektor erklären würde. Durch diese Reaktion lässt sich zudem der Anstieg der Molekulargewichte in der ersten Phase bis 68 h deuten. Bei dieser Reaktion handelt es sich allerdings um eine Gleichgewichtsreaktion, bei der als Nebenprodukt Imidazol freigesetzt wird. Durch die zweite Reaktion, die hauptsächlich beabsichtigte Kopplung von HEMA-CI mit HES zu HESHEMA, wird ebenfalls Imidazol freigesetzt. Mit zunehmendem Gehalt an Imidazol wird das Gleichgewicht der ersten Reaktion wieder auf die Seite der Edukte verschoben, wodurch der Carbonatester zwischen den HES- oder HESHEMA-Polymeren wieder aufgebrochen wird.

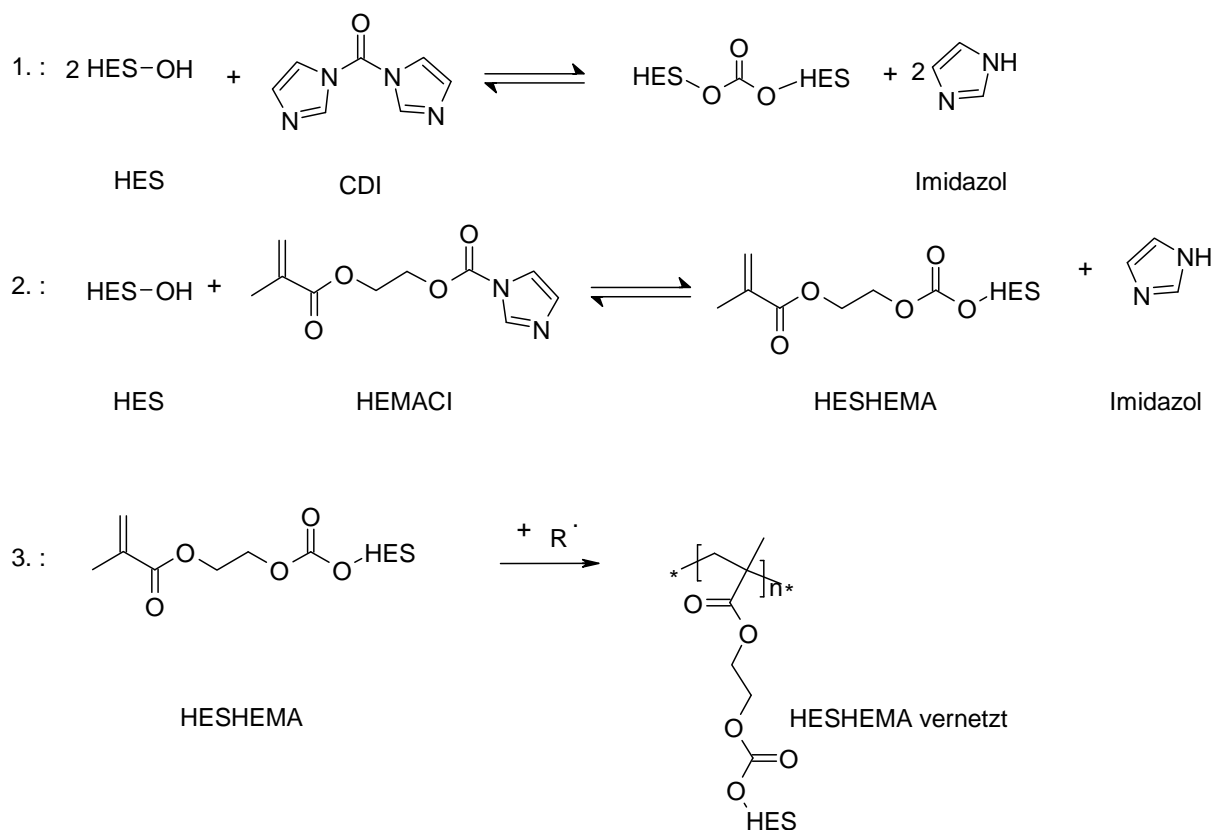


Abb. 31: Erklärungsvorschlag des Molekulargewichtverlaufs bei der HESHEMA-Herstellung

Somit nimmt das Gesamtmolekulargewicht der Probe mit der Zeit wieder ab, da die hochmolekularen über Carbonatester verknüpften Polymermoleküle wieder einzeln vorliegen. Diese Verschiebung des Gleichgewichts kann somit die Abnahme des Molekulargewichts erklären, die in der zweiten Phase der HESHEMA-Herstellung beobachtet wird. In der Probenreihe, deren GPC-Elutionsprofile in Abb. 30 wiedergegeben sind, nimmt dieser Abbau auch weiter zu, da das Maximum der Probe nach 120h zu niedrigeren Elutionsvolumina verschoben ist und auch ein Tailing aufweist.

Zusätzlich zu diesen zwei Reaktionen kommt es allerdings auch zur teilweisen radikalischen Vernetzung der HESHEMA-Moleküle über die Reaktion der Methacrylatfunktion zu „HESHEMA vernetzt“ (vgl. Abb. 31, 3.). Die Quelle dieser Radikale könnten durch die Probenentnahme eingebrachte Sauerstoffradikale sein. Auch eine photoinitierte Autopolymerisation wäre denkbar. Diese Form der Vernetzung erklärt die Zunahme der Molekulargewichte in der dritten Phase und die Abnahme der Löslichkeit der Proben mit zunehmender Reaktionsdauer. Zudem kann durch diese Reaktion die Abnahme des DS mit voranschreitender Reaktionszeit begründet werden.

Ein Einfluss des Nebenprodukts Imidazol, des Inhibitors Paracresol, des Edukts HEMA oder des DMAPs auf das Polymerrückgrat kann ausgeschlossen werden, da deren jeweiliger

einzelner Einsatz aber auch in Kombination keine Veränderung der GPC-Elutionsprofile bewirken (s.

Abb. 21).

Um diesen Reaktionsvorschlag zu unterstützen, müssen mehr Experimente durchgeführt werden, bei denen diese vorgeschlagenen Reaktionen beleuchtet werden. Eine Verfolgung des Imidazolgehalts und des HEMA-CI-Gehalt z.B. mittels Gaschromatographie könnte zur Aufklärung dieser Reaktionsverläufe beitragen.

3.2.5 Abbauverhalten von HESHEMA

Für den Einsatz als Matrixmaterial für DDS muss das verwendete Polymer biokompatibel und bioabbaubar sein. Dies ist für HES der Fall²¹, HESHEMA wurde bislang in dieser Hinsicht noch nicht untersucht. In ersten Experimenten wurde daher HESHEMA mit 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (EC 3.2.1) (α -Amylase) umgesetzt. Dieses Enzym gehört zu der Gruppe der Hydrolasen, die in Stärke (Amylose, Amylopektin) und Glycogen die α -1,4-Verknüpfung im Inneren der Kette statistisch spaltet. Es handelt sich daher um ein Endoenzym. Die α -1,6-Bindung wird dabei nicht hydrolysiert und bleibt erhalten.

Zur Untersuchung des Abbauverhaltens wurde eine HESHEMA-Probe und HES mit α -Amylase inkubiert. Diese HESHEMA-Probe weist ein DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,34, ein HEMA-CI/HES Verhältnis von 25/100 mol/L und eine Reaktionsdauer von 44 h auf. Bei den Abbauuntersuchungen werden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und die entsprechende Menge α -Amylase-Lösung wieder zugegeben, um eine möglichst hohe Konzentration an Enzym zu gewährleisten. Die α -Amylase wird durch Erhitzen denaturiert und abfiltriert. Diese Lösungen werden gefriergetrocknet. Die Proben werden daraufhin im Elutionsmittel gelöst und mittels GPC gemessen (Abb. 32 und Abb. 33). Diese Aufarbeitungsschritte sind nötig, um Artefakte im Brechungsindex aufgrund unterschiedlicher Lösungsmittel zu vermeiden.

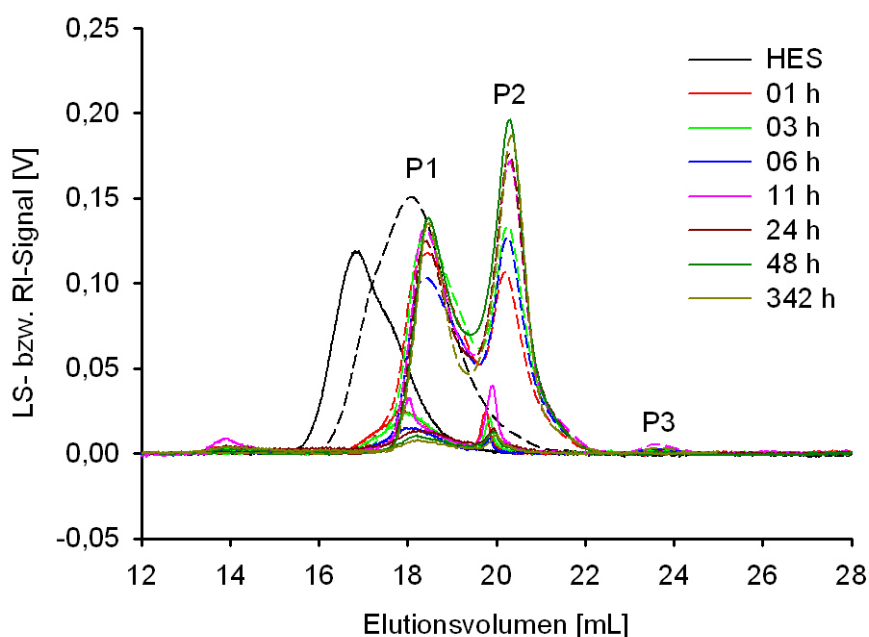


Abb. 32: GPC-Elutionsprofile des enzymatischen Abbaus von HES durch α -Amylase (- = Lichtstreuendetektorsignal (LS); --- = Brechungsindexdetektor(RI))

In Abb. 32 ist als Vergleich das Elutionschromatogramm der HES-Probe vor der Enzymzugabe aufgetragen. Es zeigt sich, dass HES durch die verwendete α -Amylase abgebaut wird, da die entstehenden Signale zu deutlich höheren Elutionszeiten verschoben werden. Dabei zeigen sich drei Peaks. Der erste Peak (P1) hat sein Maximum bei 18 ml, der zweite (P2) bei 20 mL. Die ersten beiden Peaks gehen dabei in einander über. Der zweite Peak weist im RI-Detektorsignal ein deutlich stärkeres Signal auf als der erste Peak. Der dritte Peak (P3) zeigt eine sehr kleine Signalhöhe auf bei einem Elutionsvolumen von 23 mL.

Die Abbauprodukte von HESHEMA weisen geringfügig andere GPC-Elutionschromatogramme auf (Abb. 33). In dieser Darstellung ist als Vergleich das Elutionschromatogramm der Probe vor der Enzymzugabe aufgetragen (HESHEMA). Es zeigt sich, dass HESHEMA durch die verwendete α -Amylase ebenfalls abgebaut wird, da die entstehenden Signale zu deutlich höheren Elutionszeiten verschoben werden. Die Lichtstreuensignale bei 14 mL resultieren aus noch nicht vollständig gelösten Polymeragglomeraten. Da diese im konzentrationsabhängigen Brechungsindexdetektor kein Signal liefern, ist ihre Konzentration sehr gering und sollen nicht weiter betrachtet werden. Die Proben zeigen allerdings in beiden Detektoren drei Peaks. Der erste Peak (P1) hat sein Maximum bei 18 ml, der zweite (P2) bei 20 mL. Die ersten beiden Peaks gehen dabei

ineinander über. Der zweite Peak weist im RI-Detektorsignal ein deutlich stärkeres Signal auf als der erste Peak. Bei kleinen Reaktionszeiten des Abbaus der HESHEMA mit α -Amylase besteht eine Schulter zwischen den beiden Peaks. Mit zunehmender Reaktionsdauer wird der Übergang zwischen dem ersten und dem zweiten Peak schärfer.

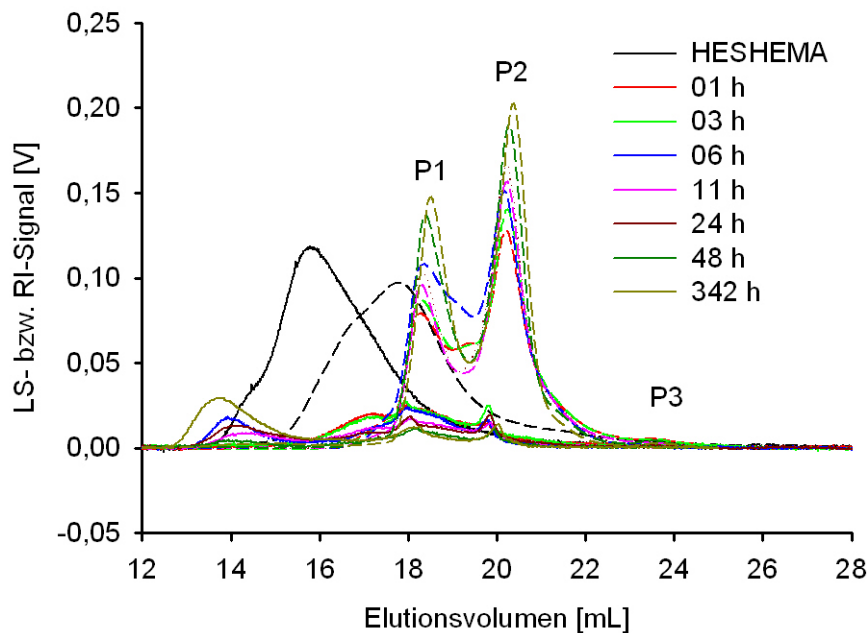


Abb. 33: GPC-Elutionsprofile von HESHEMA nach enzymatischem Abbau durch α -Amylase
(- = Lichtstreuendetektor; --- = Brechungsindexdetektor)

Ein dritter Peak mit einer sehr kleinen Signalthöhe im Brechungsindexdetektor tritt, analog zu den HES-Chromatogrammen, bei einem Elutionsvolumen von 23 mL auf. Bei diesen kleinen Peaks bei sehr hohen Elutionsvolumina scheint es sich um Monomere oder Oligomere zu handeln, da sie kein Signal im Lichtstreuendetektor bewirken. Da ihr Anteil sehr gering ist und somit Aussagen sehr fehlerbehaftet wären, werden im Folgenden nur die ersten beiden Peaks näher betrachtet.

Die Signalthöhen dieser Peaks im Lichtstreuendetektor sind sehr gering. Die Auswertung über die Lichtstreuendetektorsoftware ergibt dabei Messergebnisse mit großen Messungenauigkeiten. Daher wurde eine Kalibrierung der Säulen mit engverteilten Pullulanstandards durchgeführt. Hydroxyethylstärkestandards waren, zum Zeitpunkt der Untersuchungen, nicht zugänglich, woraufhin auf das strukturell ähnliche Polysaccharid Pullulan zurückgegriffen wurde. Die somit relativ zu Pullulan bestimmten mittleren Gewichtsmittel \overline{M}_w der Peaks P1 (bei 18 mL) und P2 (bei 20 mL) lassen sich gegen die Abbaudauer auftragen (Abb. 34):

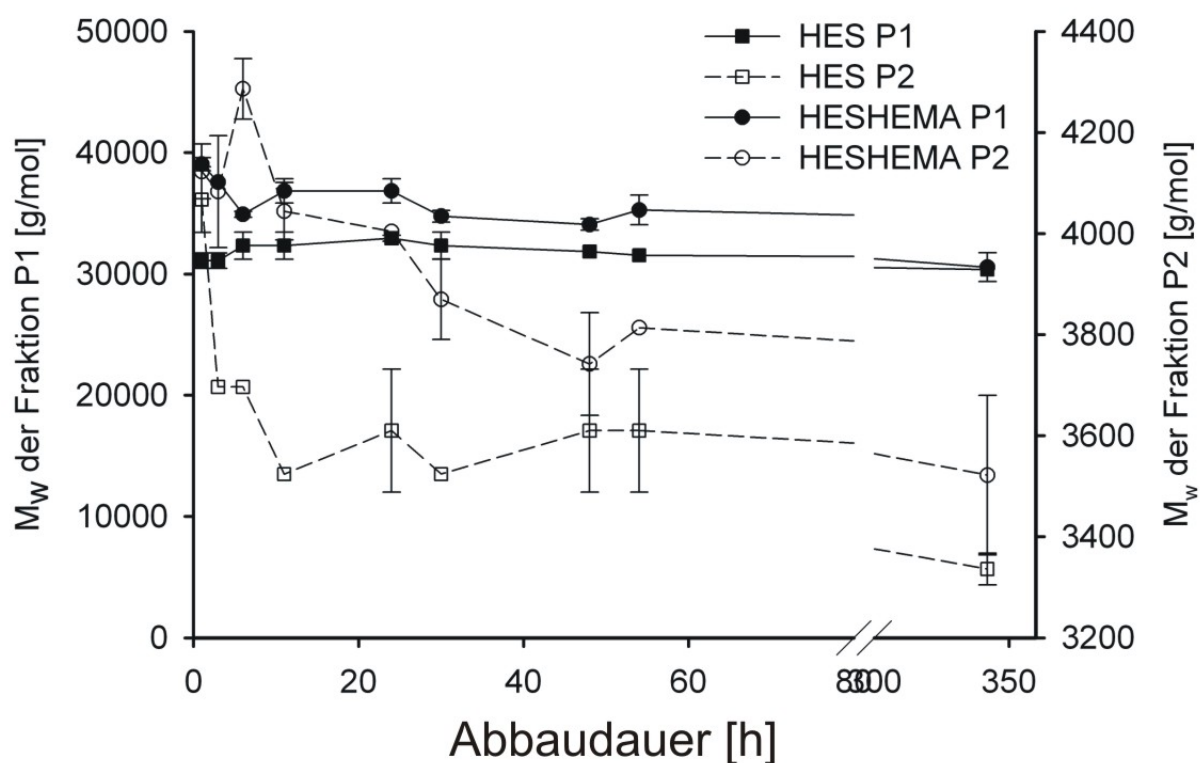


Abb. 34: Mittleres Gewichtsmittel \overline{M}_w der Peaks P1 (bei 18 mL) und P2 (bei 20 mL) [g/mol] vs. Abbaudauer [h]

Auf der linken Ordinate sind die mittleren Gewichtsmittel \overline{M}_w aus dem ersten Peak (P1) (in g/mol) und auf der rechten Ordinate die Werte des mittleren Gewichtsmittel \overline{M}_w des zweiten Peaks (P2) aufgetragen. Die Dauer des enzymatischen Abbaus mit α -Amylase ist auf der Abszisse wiedergegeben. Die \overline{M}_w -Werte des Peaks P1 der HES zeigen nahezu konstante Werte von 32000 g/mol über die Reaktionsdauer. Für den zweiten Peak der HES nimmt das \overline{M}_w von 4100 auf 3500 g/mol über die Reaktionsdauer ab. Der erste Peak P1 der HESHEMA nimmt von 39000 g/mol auf 32000 g/mol nach 342 h ab. Bis 54 h sind die \overline{M}_w -Werte der HESHEMA noch größer als die der HES, nach 342 h zeigen beide Polymere dasselbe Elutionsvolumen. Die \overline{M}_w -Werte für den P2 des HESHEMA sind nach 1 h genauso groß wie die des HES, bis zu 48 h sind sie allerdings jeweils größer als die der HES. Nach 48 h sind die \overline{M}_w -Werte der P2-Peaks so groß wie die der HES. Die Daten aus dem Vergleich mit den Pullulanstandards und den Lichtstreuungssignalen liegen im gleichen Größenbereich, allerdings weisen die Lichtstreuungssignale einen sehr hohen Fehler auf, da die untere Detektionsgrenze unterschritten wird¹⁴⁴.

Die Daten zur HES zeigen, dass dieses Polymer durch die verwendete α -Amylase in drei Fraktionen aufgeteilt wird, einen Block mit 30000 g/mol, einen zweiten Hauptblock mit 4000 bis 3500 g/mol und kleine Oligomer- bzw. Monomerbestandteile mit ca. 170 g/mol. Da die ersten beiden Peaks ineinander übergehen, kann eine quantitative Aussage über die Konzentrationsverhältnisse nicht erfolgen. Abschätzend beträgt das Signal des P1-Teils 40 % und der des P2-Signals ca. 60 % des Gesamtsignals. HES ist hauptsächlich α -1,4-verknüpft mit einigen α -1,6-Verzweigungen¹¹². Das Substitutionsverhältnis¹¹² C2/C6 ist ≥ 8 , d.h. die Hydroxyethylgruppen sind achtmal häufiger an der C2-Position des Glucoserings substituiert als an der C6-Position. Durch Substituenten in C2-Position wird der enzymatische Abbau der α -1,4-Verknüpfung durch α -Amylase behindert¹¹³. Der Abbau der HES in drei Fraktionen spricht dafür, dass die Hydroxyethylgruppen entlang des HES-Polymeren nicht statistisch verteilt sind, sondern eher blockartig. Daraus lassen sich folgende Strukturen vermuten. Es gibt Blöcke, die verzweigt sind und stark substituiert, so dass Molekulargewichte von 30000 g/mol möglich sind. Der nächstkleinere Block ist womöglich ebenfalls stark substituiert, aber nicht verzweigt, wodurch sich ein Molekulargewicht von ca. 4000 g/mol erklären lässt. Diesen beiden Hauptfraktionen sind über nichtsubstituierte Bereiche verknüpft, die von der α -Amylase zu den Monomeren abgebaut werden konnten.

Ebenso wie die HES wird auch HESHEMA zu drei Fraktionen abgebaut. Die beobachtete Schulter zwischen den beiden Hauptpeaks bei geringer Abbaudauer zeigt, dass die Substitution mit HEMACI den Abbau durch α -Amylase verzögert und zu etwas größeren Molekulargewichten führt. Allerdings werden bei entsprechend langer Reaktionsdauer Fraktionen mit HES ähnlichen hydrodynamischen Volumen erhalten. Somit lässt sich aus diesem ersten Test zur enzymatischen Abbaubarkeit von HESHEMA festhalten, dass der Abbau verzögert wird, allerdings nach 342 h ähnlich große Polymerbruchstücke liefert wie die eingesetzte HES.

3.3 Hydrogele aus HESHEMA

Die Standardverfahren zur Untersuchung von Hydrogelen sind Quellungsmessungen und rheologische Untersuchungen. Die Ergebnisse der HESHEMA-Proben mit diesen Untersuchungsmethoden werden im Folgenden vorgestellt. Für die Messverfahren müssen aus den Polymerproben Hydrogele hergestellt werden. Vorarbeiten haben gezeigt, dass sich mit 10 wt.%igen Lösungen von HESHEMA mit 0,01 wt.% des Photoinitiators Irgacure 2959 nach 30 minütiger Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm, 3-5 mW/cm²) Hydrogele herstellen lassen²⁴. Der Gelbildungsprozeß lässt sich folgendermaßen illustrieren (Abb. 35):

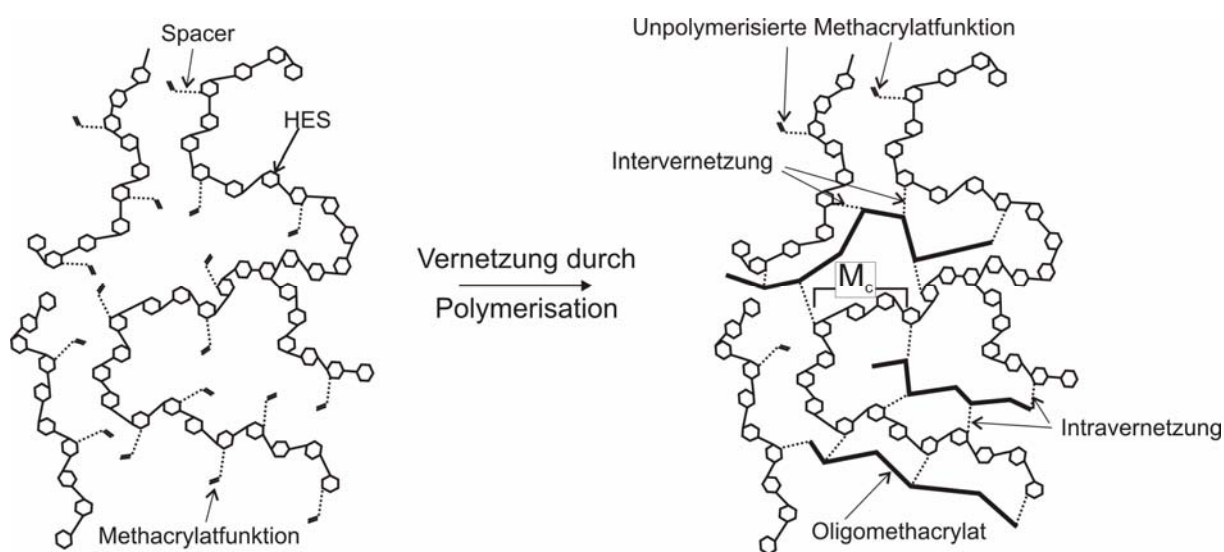


Abb. 35: Schematische Darstellung aus Ref. ²⁵, dort für die Vernetzung von dexMA verwendet

Vor dem Vernetzen liegen die HESHEMA-Polymerketten, bestehend aus dem HES-Rückgrat und den durch Spacereinheiten mit dem Polymerrückgrat verbundenen Methacrylatfunktionen, nebeneinander vor. Kommt es unter UV-Lichteinwirkung zur Bildung von Radikalen durch den Zerfall des Photoinitiators, reagieren benachbarte Methacrylatgruppen miteinander und bilden Oligomethacrylate aus. Dadurch kommt es zur intermolekularen Vernetzung zwischen den HESHEMA-Molekülen, aber auch zu intramolekularen Verknüpfungen von einzelnen Polymerschlaufen. Es können zudem auch noch unreaktierte Methacrylatfunktionen vorliegen. Die Maschenweite des entstehenden Netzwerks kann über das mittlere Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten \overline{M}_c beschrieben werden. Zu Hydrogelen konnten allerdings nur Proben mit einem maximalen DS von 0,2 umgesetzt werden, da Proben mit höherem DS nicht mehr wasserlöslich sind und nur

noch in DMSO gelöst werden können, was den Einsatz als DDS für pharmazeutisch aktive Proteine verhindert.

Bei der Gelherstellung kommt es zur Phasenseparation. Vor der Vernetzung sind die Lösungen transparent farblos bis leicht weißlich. Die entstehenden Gele sind leicht opak weißlich. Bei der Handhabung dieser Gele zeigt sich, dass mit zunehmender Opakizität die Gele steifer werden. Um diese Phasenseparation näher zu untersuchen, wurden Kryo-REM-Aufnahmen von zwei Hydrogelproben aus unterschiedlichen HESHEMA-Polymeren mit unterschiedlichem DS und unterschiedlichem Molekulargewicht gemacht (Abb. 36). Durch die Kryofixierung lassen sich biologische und wasserhaltige Proben wie Hydrogele im hydratisierten Zustand durch extrem schnelles Abkühlen vitrifizieren. Die Erhöhung der Viskosität des Wassers zu einem amorphen Feststoff erfolgt dabei ohne Eiskristallbildung, so dass Artefakte aus Kristallbildungen des Wassers ausgeschlossen werden können. Der entstandene Feststoff wird mit Platin besputtert und im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die wasserhaltigen Objekte in ihrem funktionellen Zustand konserviert werden und Artefakte wie Eiskristallbildung aus dem Einfrierprozess ausbleiben, so dass Untersuchungen im nahezu nativen Zustand durchgeführt werden können¹⁴⁵.

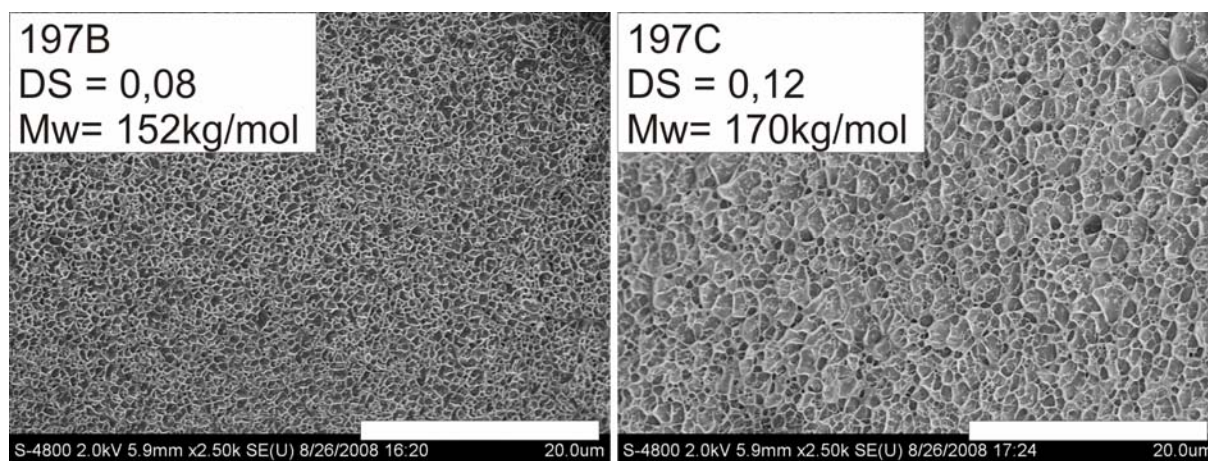


Abb. 36: Kryo-REM Aufnahmen (Kryo-high Resolution SEM, S-4800, Hitachi, Institut für Chemie, Universität Potsdam) zweier HESHEMA-Hydrogelproben

Beide Hydrogelproben weisen unregelmäßige Poren auf. Die Probe mit dem kleineren DS und auch kleinerem Molekulargewicht zeigt dabei, innerhalb der betrachteten Abschnitte, im Durchschnitt kleinere Porendurchmesser als die Vergleichsprobe mit einem höheren DS und höheren Molekulargewicht. Aus dieser qualitativen Betrachtung geht hervor, dass das Molekulargewicht entscheidend für die Phasenseparation und somit die Ausbildung der Poren

im Bereich von 0,5 bis 3 μm beeinflusst. Die Maschen, die sich durch die Vernetzung ausbilden, sind im Größenbereich von Nanometern, und somit durch Elektronenspektroskopieverfahren nicht abbildbar. Für weitergehende quantitative Aussagen müssten aber noch deutlich mehr Proben untersucht werden. Eine quantitative Auswertung kann daher nur mit den Hydrogelcharakterisierungsmethoden wie Quellungsmessungen, Rheologie und MRX erfolgen, deren Ergebnisse in den folgenden Kapiteln wiedergegeben werden.

3.3.1 Quellungsmessungen an HESHEMA-Hydrogelen

Um das Quellverhalten untersuchen zu können, wurden die Hydrogelproben mit der Filtermethode¹⁴⁶ gemessen. Dazu werden zunächst zylindrische Gelkörper mit einem Volumen von ca. 150 μL und einer Höhe von ca. 0,5 cm hergestellt. Diese Gelkörper wurden auf einem saugfähigen Filterpapier gewogen. Mit dem Filterpapier wird Wasser von der Oberfläche des Probenkörpers entfernt. Das Gewicht des befeuchteten Filterpapiers wird daraufhin vom Gewicht des Filterpapiers mit Gelkörper subtrahiert, wodurch die Masse des Gelkörpers bestimmt werden kann. Die Proben werden in Wasser bei Raumtemperatur gelagert und mit der beschriebenen Methode in zeitlichen Abständen gemessen, bis sich eine gleich bleibende Masse einstellt. Die Proben werden daraufhin durch Lyophilisation getrocknet und die Trockenmasse bestimmt. Aus dem Quotienten der Masse des gequollenen Probenkörpers zu der Masse des getrockneten Probenkörpers zum jeweiligen Messzeitpunkt t ergibt sich die massenbezogene Quellungsrate q .

Diese lässt sich in die Gleichung (5) einsetzen, um die zur $\overline{M_c}$ -Bestimmung notwendige volumenbezogene Quellungsrate Q zu erhalten:

$$Q = 1 + \frac{\rho_2}{\rho_1}(q - 1) \quad (5)$$

Mit der volumenbezogene Quellungsrate Q lässt sich das mittlere Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten $\overline{M_c}$ über die Gl. (8) ermitteln.

$$\overline{M}_c = \frac{Q^{5/3}V_1}{\left(\frac{1}{2} - 2\chi_1\right)\overline{v}} \quad (8)$$

In dieser Gleichung ist das spezifische Volumen des Polymers \overline{v} [m³ kg⁻¹] gegeben aus dem Kehrwert der Dichte des Polymeren, welche experimentell mittels Pyknometer bestimmt wurde. Das molare Volumen des Wassers V_1 , welches als Quellmittel verwendet wird, beträgt 1,807•10⁻⁵ m³/mol. Der Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter χ_1 wird in erster Näherung mit dem Wert von Dextran gleichgesetzt, der 0,473 beträgt¹²¹. Diese Näherung ist zulässig, da die verwendete Hydroxyethylstärke im weiteren Sinne eine ähnliche chemische Struktur aufweist wie Dextran²¹.

Mit dieser Methode wurde ein HESHEMA-Reaktionsansatz, der einen dreiphasigen Verlauf des Polymerisationsgrades über die Reaktionsdauer aufweist und deren GPC-Ergebnisse auch schon im Kapitel 3.2.3.2 vorgestellt worden sind, gemessen (Abb. 37). Bei diesem Reaktionsansatz wurde ein HEMA-CI/HES Verhältnis von 25/100 und ein DMAP/HEMA-CI Verhältnis von 1,34 eingesetzt und Proben nach unterschiedlichen Reaktionszeiten entnommen. In Abb. 37 sind neben den \overline{M}_c -Werten [g/mol] auch die \overline{M}_w -Werte [g/mol] und die DS-Werte der HESHEMA-Probenreihe als Vergleich aufgeführt.

Die Resultate der Untersuchungen zur Substitution haben einen dreiphasigen Reaktionsverlauf ergeben. Wenn die Proben aus den verschiedenen Phasen (siehe Kap. 3.2.3.2 und Abb. 26) photochemisch vernetzt werden und die \overline{M}_c -Werte bestimmt werden, so lassen sich diese Phasen auch in diesen Werten wieder finden.

- In der ersten Phase von 24h bis 72h sinkt der \overline{M}_c -Wert von 80000 g/mol bei 24h auf 70000 g/mol bei 44h und steigt auf 100000 g/mol nach 72h.
- In der zweiten Phase von 72h bis 95h nimmt der \overline{M}_c -Wert weiter zu auf 120000 g/mol.
- In der dritten Phase von 95h bis 120h sinkt der Wert für \overline{M}_c wieder auf 70000 g/mol.

Für diese Messergebnisse kann folgender Lösungsvorschlag angegeben werden:

Das mittlere Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten \overline{M}_c ist ein Maß für die Größe der Masche des Hydrogelnetzwerks, je kleiner \overline{M}_c ist, umso kleiner ist die entsprechende Masche. In der ersten Phase nimmt das \overline{M}_c ab, da der Substitutionsgrad zunimmt. Durch den höheren DS wird der mittlere Abstand der vernetzbaren

Methacrylatgruppen entlang der Polymerkette kleiner und somit auch das \overline{M}_c . Der darauf folgende Anstieg der \overline{M}_c -Werte lässt sich nicht mit dem DS erklären, da dieser zunimmt und sich somit das \overline{M}_c verringern sollte. Der Anstieg des \overline{M}_c erfolgt womöglich aus der Schädigung der Ausgangspolymere, wodurch diese nicht mehr engmaschig vernetzen können.

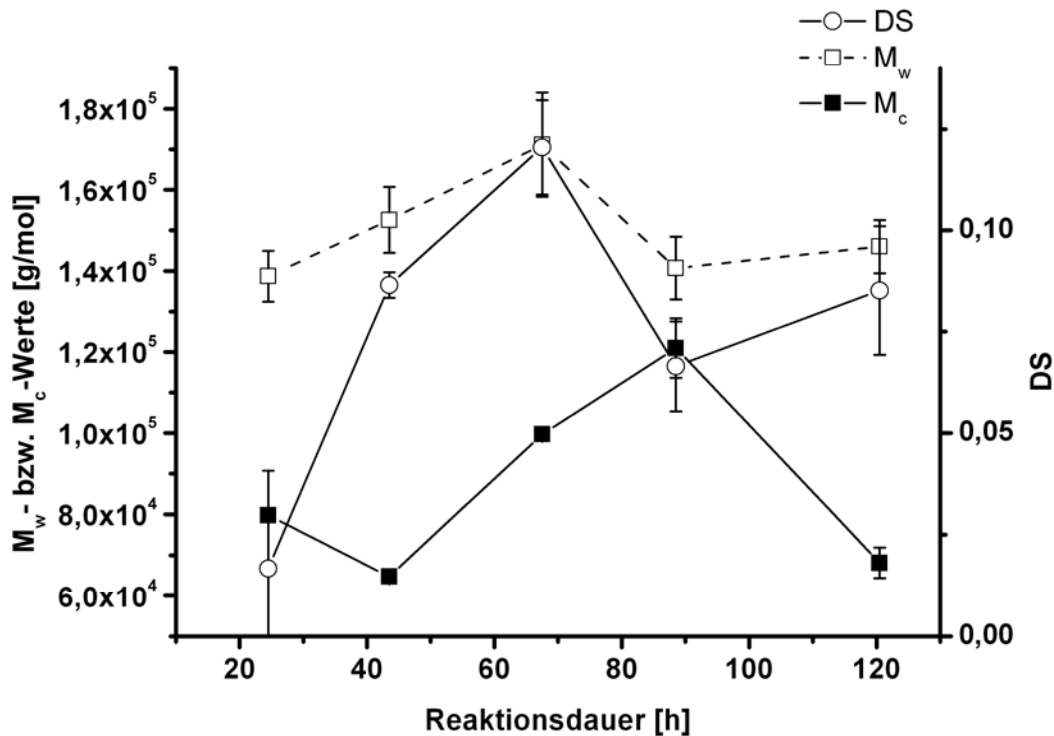


Abb. 37: Vergleich der \overline{M}_c -Werte [g/mol] (■) für Hydrogele nach 30 Min UV-Vernetzung aus HESHEMA-Probenreihe (HEMA-CI/HES: 25/100, DMAP/HEMA-CI: 1,34) mit den \overline{M}_w -Werten [g/mol] (□) und DS-Werten (○) nach unterschiedlicher Reaktionsdauer [h] in der HESHEMA-Herstellung

Der weitere Anstieg der \overline{M}_c -Werte zum maximalen \overline{M}_c -Wert von 120000 g/mol, der sich am Ende der zweiten Phase der HESHEMA-Polymere (nach 95h) einstellt, kann durch die Spaltung der Carbonatester zwischen den HES-Ketten vor dem Vernetzen erklärt werden. Wird eine Carbonatesterbindung zwischen zwei Polymerketten A und B aufgespalten, wird der Abstand zwischen den vernetzbaren Methacrylatgruppen der beiden Ketten vergrößert. Dadurch bilden sich größere Maschen und das \overline{M}_c nimmt zu.

In der dritten Phase der HESHEMA-Herstellung haben sich Polymere gebildet, die teilweise schon über die Methacrylatgruppen vernetzt sind. Vor dem Start der Vernetzung durch Polymerisation sind somit die unvernetzten Methacrylatgruppen räumlich schon sehr nah

zusammen und können somit leicht miteinander vernetzen. Zudem wirken Vernetzungen, die vor der UV-Polymerisation erfolgten, auch als Masche und beeinflussen den geringen Wert für \overline{M}_c des gesamten Hydrogels.

Vergleichend zu den vorgestellten Proben, bei deren Herstellung DMAP eingesetzt wurde, wird die Probenreihe aus dem Reaktionsansatz, der ohne DMAP Zugabe hergestellt und ebenfalls schon im Kapitel 3.2.3 betrachtet wurde, hinsichtlich ihres Quellungsverhaltens untersucht (Abb. 38).

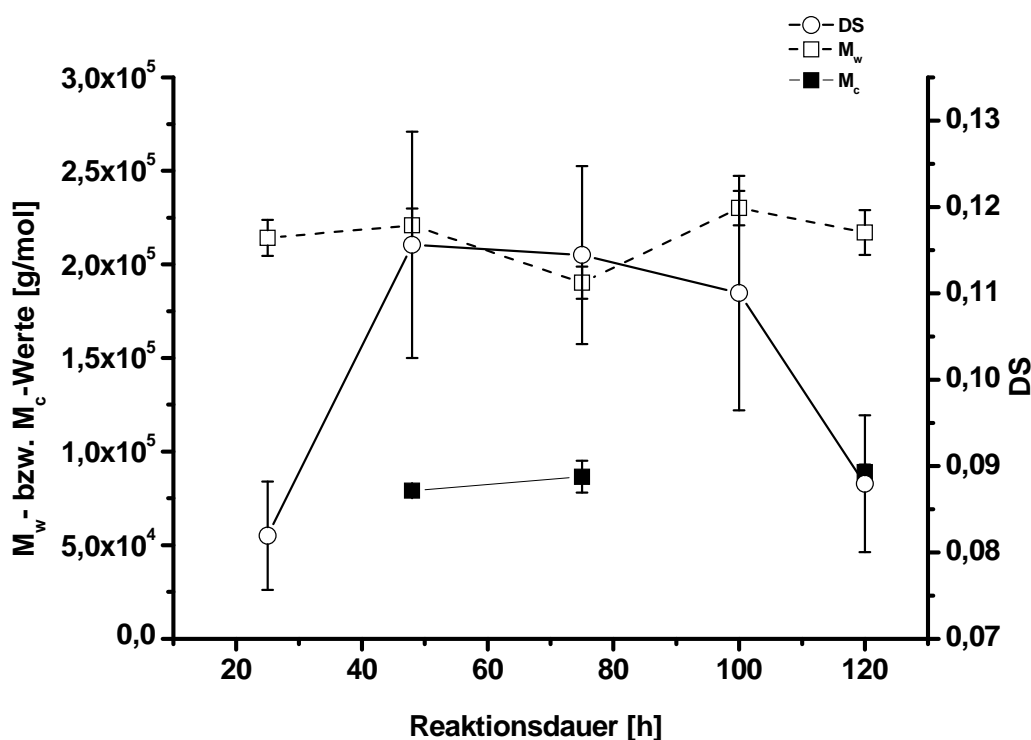


Abb. 38 Polymer- vs. Hydrogeleigenschaften der HESHEMA-Reihe ohne DMAP (HEMA-CI/HES: 25/100, kein DMAP), \overline{M}_c -Werte [g/mol] (■) für Hydrogele nach 30 Min UV-Bestrahlung, \overline{M}_w -Werte [g/mol] (□) und der DS (○) gegen die Reaktionsdauer [h]

Bei dieser Probenreihe nimmt das \overline{M}_c gering von 79000 auf 88000 g/mol zu und ist somit nahezu konstant innerhalb der Messungenauigkeit der Quellungsmessung. Die \overline{M}_w - und DS-Werte sind für diese Probenreihe auch nahezu konstant, so dass die geringen Unterschiede der \overline{M}_c -Werte nicht überraschen. Die geringe Abnahme der \overline{M}_w -Werte nach 78 h bewirkt lediglich eine Vergrößerung der Standardabweichung um den Mittelwert bei dem \overline{M}_c -Wert der Probe. Interessant ist die Tatsache, dass die Hydrogele dieser Polymerreihe mit \overline{M}_w -

Werten von ca. 200000 g/mol ähnlich große Maschenweiten mit \overline{M}_c -Werten im Bereich von 80000 g/mol zeigen wie die Polymere aus dem Reaktionsansatz mit DMAP-Zugabe, die Molekulargewichte im Bereich von 150000 g/mol aufweisen.

Als Fazit lässt sich daher sagen, dass bei der Einstellung der Maschenweite der Substitutionsgrad DS, aber auch der Grad der Schädigung der HES-Ketten bzw. ihre vorzeitige Vernetzung in den Synthesereaktionen eine wichtige Rolle spielen. Die Schädigung und die vorzeitige Vernetzung werden durch die Qualität des HEMA-CI und die Reaktionsdauer beeinflusst. Die vielfältigen, schwer kontrollierbaren Einflussparameter in der HESHEMA-Herstellung erschweren eine gezielte reproduzierbare Einstellung der Hydrogeleigenschaften. Allerdings lässt sich als kontrollierbare Größe auf die Hydrogelbeschaffenheit eines Polymers Einfluss nehmen, indem die Bestrahlungsdauer variiert wird.

Wie schon in der Vorstellung der Methodik beschrieben, lässt sich \overline{M}_c auch über Rheologiemessungen bestimmen, mit denen der Einfluss der Bestrahlungsdauer im nächsten Kapitel näher beleuchtet werden soll.

3.3.2 Rheologiemessungen an HESHEMA-Hydrogelen

Für die Rheologiemessungen musste zunächst ein geeignetes Verfahren entwickelt werden, mit dem kontrolliert und reproduzierbar Probenkörper hergestellt werden können. Für den eingesetzten Messaufbau (Platte/Platte) müssen Probenscheiben mit einem Durchmesser von 20 mm und einer Höhe von ca. 1,3 mm hergestellt werden. Aufgrund der teilweise sehr labilen Konsistenz der entstehenden Gele wurde folgende Probenhandhabung entwickelt:

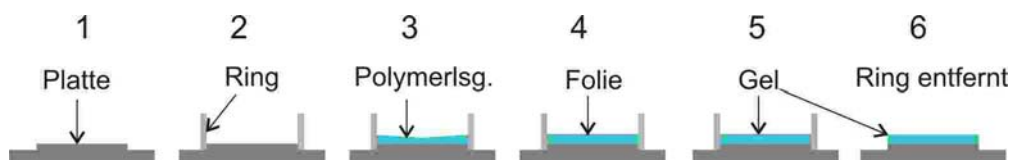


Abb. 39: Verfahren zur Herstellung von Hydrogelscheiben

Auf eine Einwegmessplatte mit einem Durchmesser von 20 mm (1) wird ein Ring aus Edelstahl mit einem Innendurchmesser von 20 mm und einer Höhe von 10 mm (2) aufgedrückt. In die entstehende Form wird die Polymerlösung gegeben (3). Da die Flüssigkeit an der Ringinnenseite einen Meniskus ausbildet und somit eine, im Querschnitt gesehen,

konkave Oberfläche bildet, wird eine UV-durchlässige PP-Folie mit einem Außendurchmesser von 19 mm und einer Dicke von 0,1 mm auf den Flüssigkeitsspiegel gelegt (4). Die Belichtungslampe wird auf den Ring gelegt und die Bestrahlung gestartet. Nach der jeweiligen Bestrahlungsdauer wird die Gelprobe (5) entnommen. Dazu wird mit einem dünnen Spatel das Hydrogel entlang der inneren Ringwand abgelöst, und der Ring vorsichtig entfernt. Durch Abnehmen mit einer Folie aus dem schon für die schwimmende Folie verwendeten Material wird die Gelscheibe erhalten. Diese wird durch Tupfen mit einem saugfähigen Tuch von überschüssiger Flüssigkeit gereinigt und auf die Messplatte gegeben (6), deren Nullabstand vorher bestimmt wurde. Die Gele werden zunächst bei einer Frequenz von 1 Hz einem Amplitudensweep unterzogen. Die dabei ermittelte Schubspannung, bei der der Speichermodul G' noch einen Plateauwert annimmt und was somit Messungen im linear viskoelastischen Bereich ermöglicht, wird bei dem darauf folgenden Frequenzsweep vorgegeben. Durch unterschiedliche Belichtungszeiten bei der Herstellung der Gelscheiben lässt sich dieser Parameter an jeweils einer Polymercharge untersuchen.

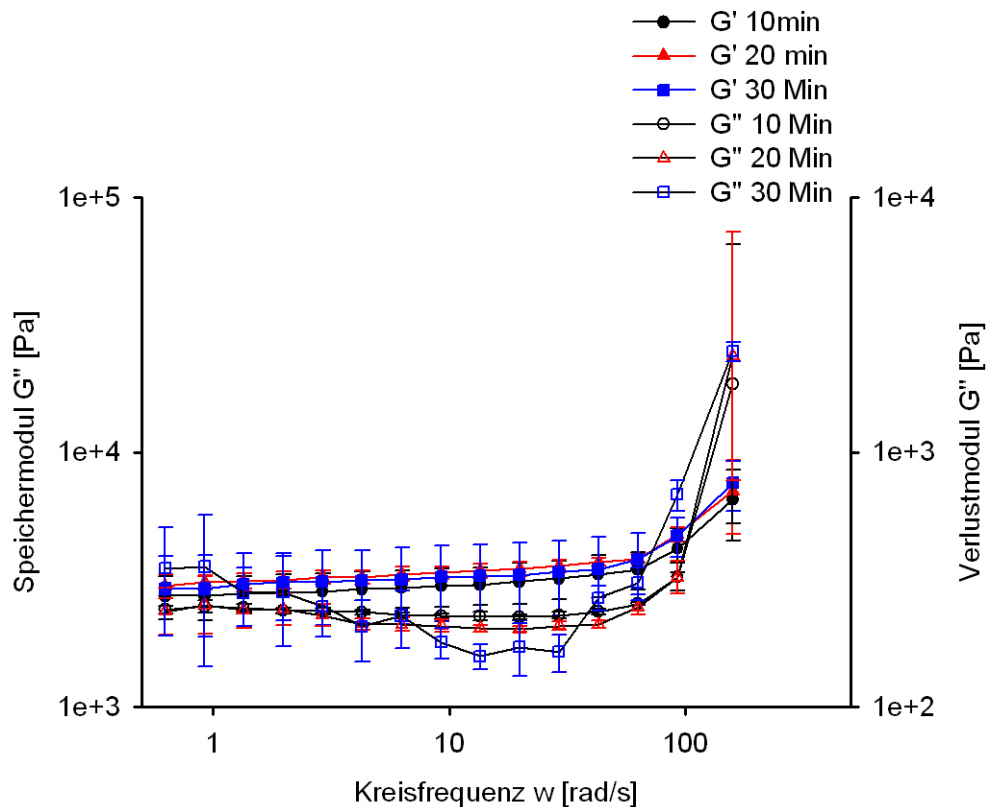


Abb. 40: Frequenzsweep von HESHEMA (HEMA-CI/HES: 25/100, kein DMAP, Herstellungsdauer: 120 h, \overline{M}_w : 220000 g/mol, DS: 0,09) -Hydrogelen nach unterschiedlich langen Bestrahlungszeiten (10 (●), 20 (▲), 30 (■) Minuten): Änderung des Speicher- (G') (gefüllte Symbole) und Verlustmoduls (G'') (leere Symbole) [Pa] mit zunehmender Kreisfrequenz w [rad/s]

In (Abb. 40) ist der jeweilige über mehrere Gelproben gemittelte Speichermodul G' und Verlustmodul G'' der gleichen HESHEMA-Charge mit unterschiedlicher Bestrahlungsdauer [min] gegenüber der Kreisfrequenz ω [rad/s] aufgetragen. Es zeigt sich, dass der Speichermodul für alle Proben einen Plateauwert annimmt, von dem dieser erst bei höheren Frequenzen abweicht. Der Verlustmodul G'' ist ca. eine 10er Potenz kleiner als der Speichermodul. Da $G' > G''$ lässt sich auch aus rheologischen Gesichtspunkten von einem Gel sprechen¹²⁵. Da diese Darstellung sehr unübersichtlich ist, wird zur weiteren Betrachtung der jeweilige Mittelwert der ersten acht Messpunkte von Gelproben mit gleicher Bestrahlungsdauer gebildet, da die Proben unter diesen Belastungen im linear viskoelastischen Bereich sind (Abb. 41):

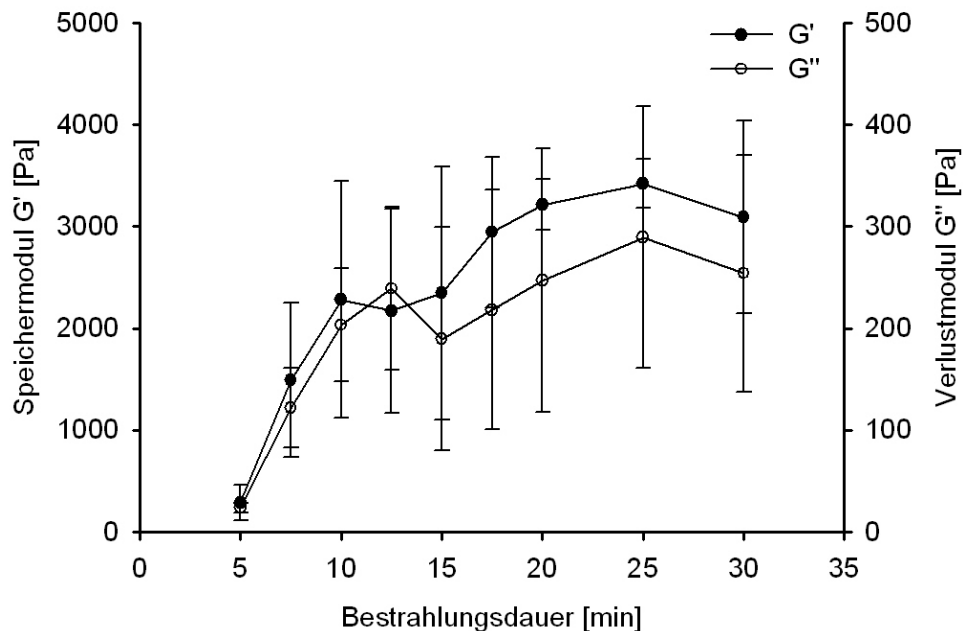


Abb. 41: Plateauwerte der Speicher(●)- und Verlustmodule (○) nach unterschiedlicher UV-Bestrahlungsdauer [min] von HESHEMA (HEMA-CI/HES: 25/100, kein DMAP, Herstellungsdauer: 120 h, \overline{M}_w : 220000 g/mol, DS: 0,09) -Hydrogelen

Der Speichermodul G' und der Verlustmodul G'' nehmen mit zunehmender Bestrahlungsdauer zu. Von 5 auf 10 Minuten Bestrahlungsdauer nehmen die Module stark zu, nach 10 Minuten ist ein Plateauwert mit geringer Steigung erreicht. Mit weiterer Bestrahlungsdauer ändern sich die Module nicht signifikant.

Um aus diesen Daten das mittlere Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten \overline{M}_c bestimmen zu können, muss die Gleichung 31 aus Kapitel 2.3.2 umgestellt werden zu:

$$\overline{M}_c = \frac{\rho RT}{G + \frac{2\rho RT}{\overline{M}_n}} \quad (42)$$

Dabei lässt sich für G der Speichermodul G' einsetzen, da im linearviskoelastischen Bereich die elastischen Eigenschaften überwiegen. Die Dichte ρ und das Zahlenmittel \overline{M}_n ergeben sich aus Dichtemessungen mittels Pyknometer und GPC-Messungen. Die allgemeine Gaskonstante R wird aus der Literatur¹⁴⁴ übernommen und als Temperatur die Messtemperatur eingesetzt.

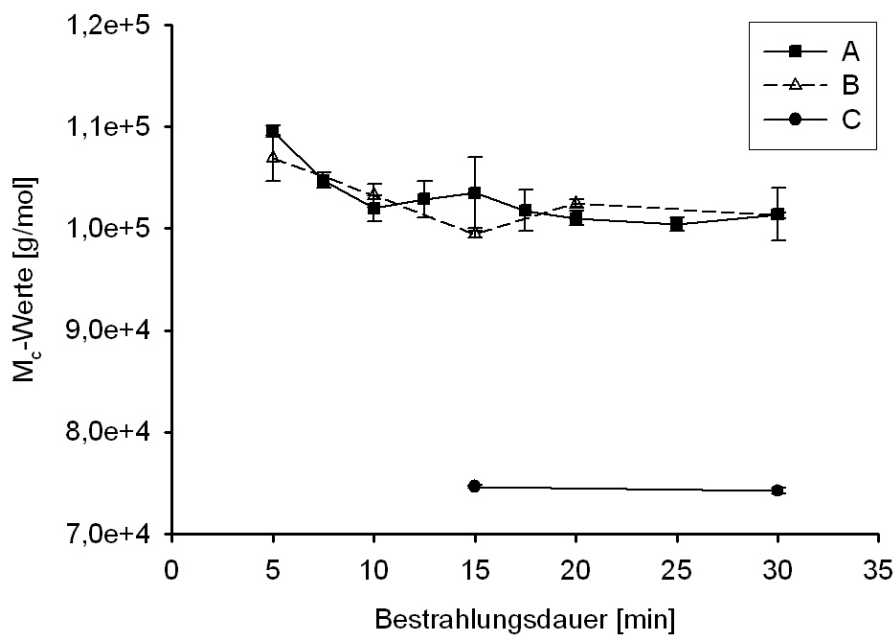


Abb. 42: \overline{M}_c aus Rheologiedaten bei unterschiedlicher Bestrahlungsdauer von drei unterschiedlichen HESHEMA-Polymeren (A■=(HEMA-CI/HES: 25/100, kein DMAP, Herstellungsdauer: 48 h, \overline{M}_w : 217000 g/mol, DS: 0,11), B△=(HEMA-CI/HES: 25/100, kein DMAP, Herstellungsdauer: 120 h, \overline{M}_w : 220000 g/mol, DS: 0,09), C●=(HEMA-CI/HES: 25/100, DMAP/HEMA-CI: 1,34, Herstellungsdauer: 43,5 h, \overline{M}_w : 170000 g/mol, DS: 0,08))

In Abb. 42 sind die berechneten \overline{M}_c -Werte nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer für drei unterschiedliche HESHEMA-Proben wiedergegeben. Von zwei Polymeren (A■=HEMA-CI/HES: 25/100, kein DMAP, Herstellungsdauer: 48 h, \overline{M}_w : 217000 g/mol, DS: 0,11); B△=(HEMA-CI/HES: 25/100, kein DMAP, Herstellungsdauer: 120 h, \overline{M}_w : 220000 g/mol,

DS: 0,09) wurden jeweils drei Gelscheiben mit Belichtungszeiten von 5 bis 30 Minuten hergestellt und gemessen. Von einem weiteren Polymer ($C\bullet$ =(HEMA-CI/HES: 25/100, DMAP/HEMA-CI: 1,34, Herstellungsdauer: 43,5 h, \overline{M}_w : 170000 g/mol, DS: 0,08) wurden jeweils drei Gelscheiben hergestellt und gemessen, die nur 15 und 30 Minuten bestrahlt wurden. Proben mit kürzerer Belichtungsdauer als 5 Minuten konnten nicht gemessen werden, da das Aufbringen in das Messgerät mit diesen sehr labilen Proben nicht reproduzierbar möglich war.

Die Gele nach nur 5 Minuten Bestrahlung ergeben bei dem Polymer A die größten \overline{M}_c -Werte mit 110000 g/mol und bei dem Polymer B einen \overline{M}_c -Wert von 107000 g/mol. Nach 7,5 bzw. 10 Minuten ist bei beiden Polymeren ein Plateauwert erreicht, der zwischen 100000 und 105000 g/mol liegt. Auch weitere Bestrahlung führt nicht zu geringeren \overline{M}_c -Werten.

Das Polymer C weist deutlich niedrigere \overline{M}_c -Wert mit 74000g/mol auf. Unterschiede durch die Belichtungszeiten sind minimal.

Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- Nach 5 Minuten lassen sich Gele herstellen mit großen Maschenweiten, deren \overline{M}_c -Werte zwischen 110000 und 107000g/mol liegen.
- Nach 7,5 bis 10 Minuten bewirkt eine weitere Bestrahlung innerhalb der Standardabweichung der Messergebnisse keine Veränderung der \overline{M}_c -Werte.
- Innerhalb des Fehlers des DS ergibt sich keine Abhängigkeit der \overline{M}_c -Werte vom DS, auch wenn sich ein Trend beobachten lässt, je geringer der DS, umso größer sind die \overline{M}_c -Werte bei gleicher Belichtungsdauer
- Neben dem DS zeigt das Molekulargewicht des verwendeten Polymers größeren Einfluss auf das erhaltende Molekulargewicht zwischen den Vernetzungspunkten. Je kleiner das Molekulargewicht, desto geringer sind die \overline{M}_c -Werte.

Die Abhängigkeit der \overline{M}_c -Werte von der Belichtungsdauer entsprechen den Erwartungen, da mit Zunahme der Bestrahlungszeit über den Zerfall des Photoinitiators mehr Radikale gebildet werden, die mit den Methacrylatgruppen reagieren und die Vernetzung auslösen. Die Hauptreaktion der gebildeten Initiatorradikale ist jedoch die erneute Kombination zum Ausgangsmolekül. Trifft ein Radikal auf eine Methacrylatgruppe, erfolgt der Kettenstart. Da die Methacrylatgruppen nicht frei beweglich sind, sondern über den Spacer an das Polymerrückgrat gebunden, erfolgt eine weitere Reaktion mit einer anderen

Methacrylatgruppe nur, wenn diese in der Nähe ist. Ist keine weitere Monomergruppe vorhanden, erfolgt der Abbruch durch Wechselwirken zweier aktiver Kettenenden (Disproportionierung oder Kombination) oder andere Abbruchreaktionen. Weitere Abbruchreaktionen sind die Wechselwirkung eines aktiven Kettenendes mit einem Initiator-molekül, die Übertragung des aktiven Zentrums auf ein anderes Molekül oder die Wechselwirkung mit Verunreinigungen wie z.B. Sauerstoff¹⁴⁴. Durch eine längere Bestrahlungsdauer ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein Photoinitiator-molekül in der Nähe einer Methacrylatgruppe zerfällt und die Vernetzung startet.

Das Ausbilden eines Plateauwertes der \overline{M}_c -Werte nach 10 Minuten deutet darauf hin, dass die Vernetzung abgeschlossen ist. Durch die Kopplung der Polymerketten untereinander können verbliebende Methacrylatgruppen nicht weiter vernetzen, da ihre Beweglichkeit durch vorhergegangene Vernetzungsreaktionen eingeschränkt wird. Da ein kompletter Umsatz der Methacrylatgruppen unwahrscheinlich ist, könnte der Grad der nichtreagierten Methacrylatgruppen durch Festkörper-NMR bestimmt werden, was allerdings aus Zeitgründen nicht erfolgt ist. Es ist zudem möglich, dass die durch UV-Bestrahlung gebildeten Radikale mit anderen Molekülen als den Methacrylatgruppen reagieren. Neben den Polymerketten können auch Peptide, wenn sie als Gastmoleküle vor dem Vernetzen in die HESHEMA-Lösung gegeben werden, mit den Radikalen reagieren. So zeigt die UV-Bestrahlung von Lysozym in Phosphatpuffer in Gegenwart des Photoinitiators Irgacure 2959 eine Schädigung des Lysozyms (bis zu 80%). In Gegenwart des HESHEMA ist diese Schädigung allerdings geringer (nur noch 20%)¹⁰⁴. Durch die Rheologiemessungen zeichnet sich aber ab, dass mit zunehmender UV-Bestrahlungsdauer keine weitere Änderung der Gelbeschaffenheit zu beobachten ist.

Die Abhängigkeit vom DS, je geringer der DS, umso größer das \overline{M}_c , entspricht ebenfalls den Erwartungen, da mit Abnahme des DS der mittlere Abstand der vernetzbaren Methacrylatgruppen entlang des Polymerrückgrates bei statistischer Substitution erhöht wird. Dieser Trend ist bei sehr geringen Belichtungszeiten am ausgeprägtesten, bei längeren Belichtungszeiten nehmen die Unterschiede ab. Allerdings sollte dieser Trend nicht überbewertet werden, da die Unterschiede der \overline{M}_c -Werte innerhalb der Messungenauigkeit liegen.

Die beobachtete Abhängigkeit der \overline{M}_c -Werte vom Molekulargewicht, je größer das Gewichtsmittel, umso größer das \overline{M}_c , ist ein wenig unerwartet. Bei gleichem DS sollten Polymere mit unterschiedlichem Molekulargewicht gleiche \overline{M}_c -Werte aufweisen. Vielleicht

lassen sich die Beobachtungen mit der Phasenseparation begründen. Je höher das Molekulargewicht der Polymere, umso stärker ist die Phasenseparation ausgeprägt. Kommt es zur Phasenseparation, ist der Transport von Methacrylatgruppen an die Radikale gehemmt. Die Polymere mit höherem Molekulargewicht können somit zu einem geringeren Maße reagieren, so dass es zu weniger Vernetzungsreaktionen kommt, was in größeren Maschen resultiert. Diese Hypothese muss allerdings mit weiteren Experimenten gestützt werden.

Als Fazit lässt sich zusammenfassen, dass sich die Gelbeschaffenheit über die Belichtungszeit in einem Zeitfenster von 5 bis 10 Minuten beeinflussen lässt, längere Bestrahlung allerdings keine weitere messbare Veränderung der \overline{M}_c -Werte bewirkt.

Da die Probenkörper aus den Rheologiemessungen eine andere Geometrie haben als die Gelzylinder aus den Quellungsmessungen und um die Rheologiedaten mit den Quellungsdaten zu vergleichen, wurden diese Gelscheiben auch mittels Quellungsmessungen untersucht. Dabei zeigt sich auch bei den Quellungsmessungen der Probenkörper, die für die Rheologiemessungen abgefertigt wurden, die Abnahme der \overline{M}_c -Werte mit der Bestrahlungsdauer (Abb. 43). Die Werte aus den Quellungsmessungen sind ein wenig größer als die aus den Rheologiemessungen.

Die Unterschiede der absoluten \overline{M}_c -Werte der beiden Messverfahren können zum einen durch die zur Auswertung verwendeten Annahmen mit den eingesetzten Konstanten verursacht werden. Durch das Einsetzen des Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameters χ_1 von Dextran anstatt dem jeweiligen Wert der verwendeten HESHEMA wurde eine Fehlerquelle geschaffen, die die \overline{M}_c -Werte der Quellungsmessungen beeinflusst. Zum anderen können Temperaturschwankungen über die Messdauer und zwischen den einzelnen Experimenten zu den Unterschieden beitragen. Ein weiterer Punkt sind Verschlaufungen, die bei Rheologiemessungen auch als Vernetzungspunkte auftreten können. Bei Quellungsmessungen spielen diese Verschlaufungen eine geringere Rolle, da durch die längere Messdauer diese temporären reversiblen Knotenpunkte aufgelöst werden. Durch das Messverfahren kommt es allerdings zu größeren Messungenauigkeiten, da besonders bei sehr labilen Gelen nach kurzer Belichtungsdauer die Handhabung erschwert ist.

Diese beiden Messverfahren weisen jedoch beide in die gleiche Richtung. In den ersten 5 bis 10 Minuten der Bestrahlung gibt es Unterschiede der Geleigenschaften, danach erfolgt keine weitere signifikante Änderung der Geleigenschaften. Als weitere empfindlichere Messmethode um den Prozess der Vernetzung zu untersuchen, wurde auf die

Magnetrelaxometrie zurückgegriffen, deren Ergebnisse im folgenden Kapitel 3.3.3 vorgestellt werden sollen.

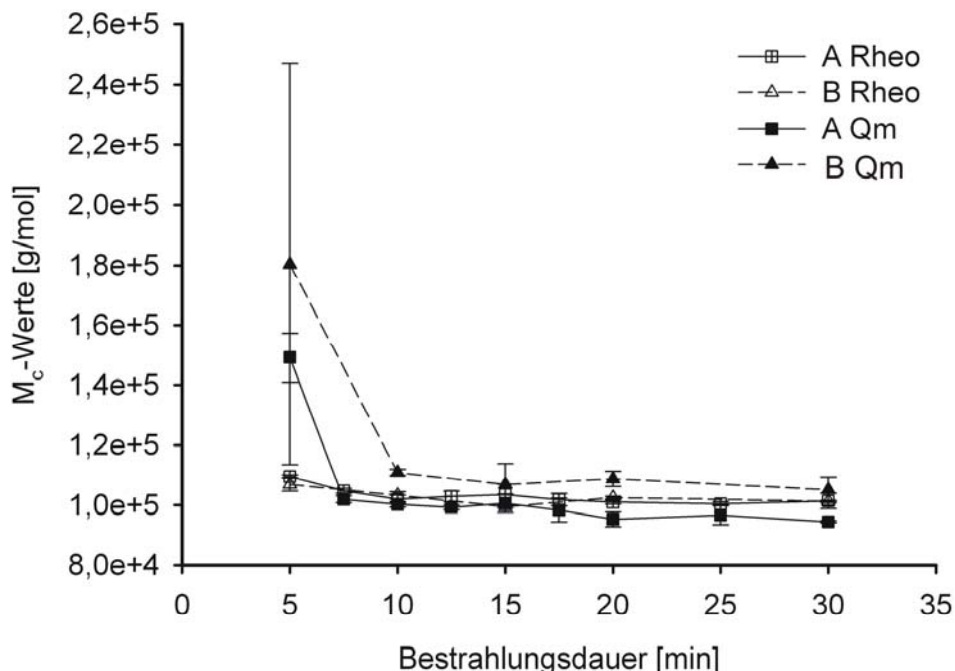


Abb. 43: \overline{M}_c aus Rheologiedaten (leere Symbole $\Delta \square$) und Quellungsmessungen (gefüllte Symbole $\blacktriangle \blacksquare$) bei unterschiedlicher Bestrahlungsdauer von zwei unterschiedlichen HESHEMA-Polymeren (A= $\square \blacksquare$ =(HEMA-CI/HES: 25/100, kein DMAP, Herstellungsdauer: 48 h, \overline{M}_w : 217000 g/mol, DS: 0,11), B= $\Delta \blacktriangle$ =(HEMA-CI/HES: 25/100, kein DMAP, Herstellungsdauer: 120 h, \overline{M}_w : 220000 g/mol, DS: 0,09)

3.3.3 Magnetrelaxometrie-Untersuchungen an HESHEMA-Hydrogelen^{22,}

137

Die Magnetrelaxometrie (MRX) soll als Messmethode an einer Probenreihe vorgestellt und mit den Standardmethoden zur Charakterisierung von Hydrogelen, der Rheologie und der Quellungsmessung, verglichen werden.

Um mit der MRX die Eigenschaften von Hydrogelen untersuchen zu können, musste zunächst eine geeignete Sorte von magnetischen Nanopartikeln (MNPs) ermittelt werden. Dazu wurden MNPs mit unterschiedlichem Hüllenmaterial untersucht¹³⁷. Um ein geeignetes Signal zu erhalten, dass nur durch die Veränderung der umgebenden Hydrogelmatrix verändert wird, wurde der Einfluss des Photoinitiators vor und nach der UV-Bestrahlung, sowie der Einfluss

der UV-Strahlung ohne Photoinitiator auf das Relaxationsverhalten der MNPs getestet. Dazu wurden die zu testenden MNP-Dispersionen im Verhältnis 1,2/300 v/v in der Photoinitiatorlösung dispergiert. Die Relaxationskurven wurden vor und nach der 30-minütigen Bestrahlung mittels UV-Licht (366 nm, 3-5 mW/cm²) gemessen und qualitativ ausgewertet. Als vergleichende Referenz wurden die MNP-Dispersionen im VE-Wasser herangezogen. Dabei ergeben sich für die verwendeten MNP-Sorten folgende Ergebnisse (Tab. 2).

Tab. 2: Verhalten der verschiedenen MNP-Dispersionen unter den Bedingungen der Hydrogelherstellung

MNP-Dispersion	Hüllenmaterial	+Photoinitiatorlsg.	+UV Licht	+Photoinitiatorlsg. +UV-Licht
fluidMAG-GA/GV	Gummi arabicum	Stabil	stabil	stabil
fluidMAG-12/AS	Polyacrylsäure	Stabil	stabil	starke Agglomeration
fluidMAG-D	Stärke-Monolayer	Stabil	leichte Agglomeration	leichte Agglomeration
fluidMAG-D/5e	Stärke-Multilayer	Stabil	stabil	starke Agglomeration
fluidMAG-Citrat	Citrat	Stabil	starke Agglomeration	starke Agglomeration
DDM128N	Carboxy-Dextran	Stabil	stabil	starke Agglomeration

Da die MNP-Dispersion fluidMAG-GA/GV unter allen getesteten Bedingungen und sogar nach 75 minütiger Bestrahlung der Photoinitiatorlösung mit UV-Strahlung stabil war, wurde diese MNP-Sorte für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Zur Untersuchung des Hydrogelbildungsprozesses und des Einflusses der Belichtungsdauer auf die Hydrogeleigenschaften wurden mit diesen MNPs Hydrogelproben hergestellt. Dazu wurden die HESHEMA Lösung (10 wt.% HESHEMA (HEMA-CI/HES: 25/100, DMAP/HEMA-CI: 1,34, Herstellungsdauer: 43,5 h, \overline{M}_w : 170000 g/mol, DS: 0,08) in 0,1 wt.% Irgacure 2959 in VE-Wasser) und die MNP-Dispersion vermischt und in acht 300 µL Mikrotitergefäße gegeben. Die acht Proben wurden mit UV-Licht (365 nm, 3,5 mW/cm²) belichtet. In Abständen von 5 Minuten wurde jeweils eine Probe unter der Belichtungslampe hervorgehoben, so dass Proben mit Belichtungszeiten zwischen 5 und 40 Minuten entstanden. Deren Relaxationsverhalten wurde mittels MRX untersucht. Zum Vergleich ist in Abb. 44 die Dispersion der MNPs in VE-Wasser (blau) gezeigt. Es ist der Einfluß der Viskosität des Trägermediums zu erkennen, da die Dispersion der MNPs in HESHEMA-Lösung (rot) schon stärkeren Néel-Charakter aufweist als die Probe mit reinem VE-Wasser. Als Referenz dient für die reine Brown-Relaxation eine Probe, die eine

entsprechende Konzentration an MNP-Dispersion in der HESHEMA-Lösung im unbelichteten Zustand enthält. Die Néel-Referenz ergibt sich aus einer Probe, bei der zunächst die jeweilige MNP-Konzentration in einer gesättigten D-Mannit Lösung eingestellt und dann gefriergetrocknet wurde, um ausschließlich immobilisierte Nanopartikel zu erhalten (schwarz). Daraus ergeben sich folgende Relaxationskurven in Abb. 44:

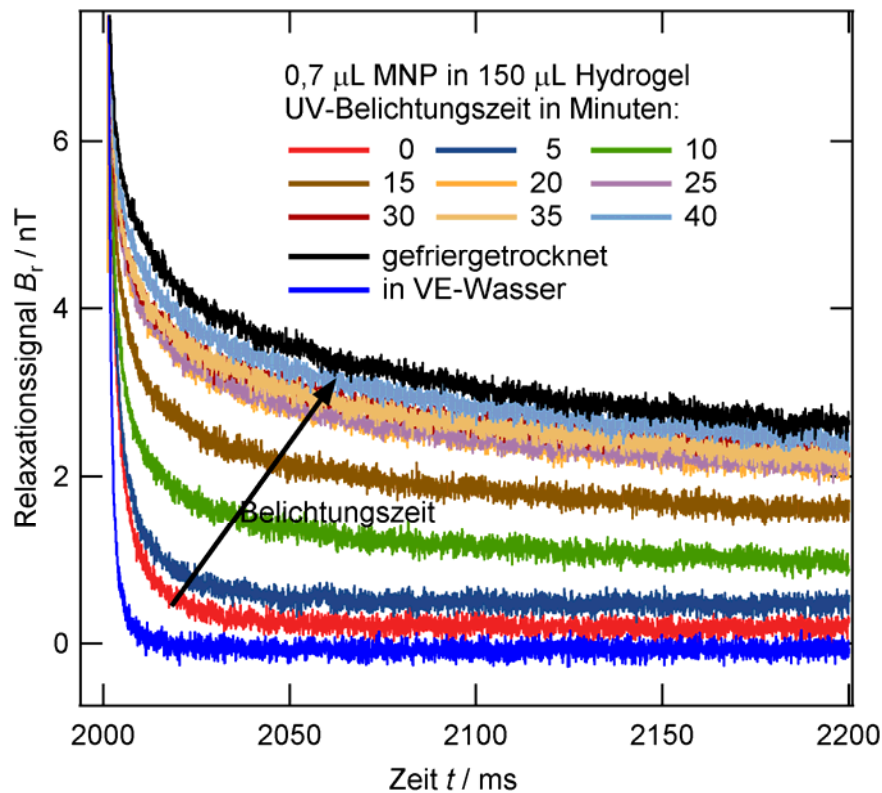


Abb. 44: Relaxationskurven der mit MNPs versetzten HESHEMA-Hydrogele nach unterschiedlicher Belichtungszeit und der Referenzmaterialien MNP in VE Wasser und MNP in Mannit gefriergetrocknet

Die Brown-Referenz (0 Min. UV, rot) zeigt einen sehr schnellen Abfall des Signals, entsprechend dem gestreckten exponentiellen Verlauf, der sich aus Gleichung (36) für die reine Brown-Relaxation ergibt. Die Néel-Referenz (gefriergetrocknet, schwarz) zeigt einen Abfalls des Signals, dass dem logarithmischen Verlauf durch die Néel-Relaxation aus Gleichung (35) entspricht. Die Proben der HESHEMA-Lösungen liegen zwischen diesen beiden Referenzen. Die HESHEMA-Probe ohne Bestrahlung (0 min. UV) zeigt eine langsamere Relaxation als die VE-Wasser Probe, da die MNP-HESHEMA-Lösung viskoser ist als die MNP-Lösung in reinem Wasser. Mit zunehmender UV-Bestrahlung ändern die Relaxationskurven ihre Form und nehmen zunehmend die Form der Néel-Referenz an. Dies

lässt sich mit der Gleichung (37) beschreiben und auswerten. Daraus ergibt sich folgender Verlauf für den Anteil der immobilisierten MNP im Hydrogel¹³⁷ (Abb. 45):

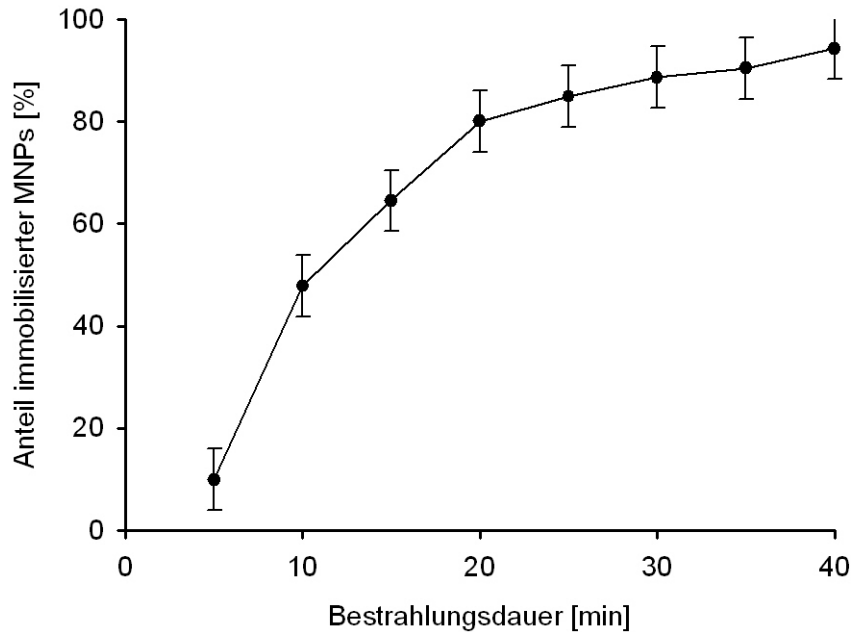


Abb. 45: Anteil der immobilisierten MNPs in HESHEMA-Matrix mit Zunahme der UV-Bestrahlungsdauer

Der Anteil der immobilisierten MNPs nimmt mit zunehmender Belichtungsdauer zu. Dabei kommt es zur graduellen Annäherung an einen Grenzwert, der nach 40 Minuten erreicht zu sein scheint. Weitere Bestrahlung (bis zu 70 Minuten Bestrahlung, Ergebnisse nicht gezeigt) ergibt keine Änderung im Vergleich zu den Proben nach 40 Minuten UV-Bestrahlung.

Um das Potential dieser neuen Art der Hydrogelcharakterisierung bewerten zu können, werden nun die mit MNPs versetzten Hydrogellösungen auch mit den Standardverfahren Rheologie (Rheo) und Quellungsmessungen (Qm) untersucht. Die Ergebnisse aus den Messungen am reinen Gel lassen sich nicht übertragen, da durch die braune Farbe der MNPs und die daraus resultierende Absorption die Photopolymerisation verlangsamt wird.

Der einfachste Test zur Gelbildung ist der „vial-inversion test“⁷². Dabei werden die Gefäße mit den Gelproben nach der jeweiligen Vernetzungsreaktion umgedreht. Bei einem Gel verbleibt das Gel am Boden des Gefäßes, bei einer Lösung fließt diese nach unten. Mit den im MRX-Experiment untersuchten Proben ergibt sich somit folgendes Bild im „vial-inversion test“ (Abb. 46) für die Probenreihe mit 0,7 µL MNP-Lösung in 150µL HESHEMA-Lösung:



Abb. 46: „vial inversion test“ an MRX-Proben

Bei dieser qualitativen Betrachtung zeigt sich, dass sich nach 15 Minuten UV-Bestrahlung Gele bilden. Unterschiede zwischen 15 und 40 Minuten UV-Bestrahlung lassen sich mit diesem Test nicht ausmachen.

Quantitative Aussagen lassen sich mit der Rheologie und der Quellungsmessung treffen. Dazu wird dieselbe Konzentration an MNPs wie bei den vorgestellten MRX-Resultaten eingesetzt. Es wurden Gelscheiben für die Rheologiemessungen hergestellt, die daraufhin für Quellungsmessungen weiter verwendet wurden. Die Daten wurden, wie schon in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, nach dem mittleren Molekulargewicht zwischen den Vernetzungspunkten \overline{M}_c ausgewertet. Dabei ergibt sich aus den Rheologiemessungen folgender Zusammenhang zur UV-Belichtungsdauer (Abb. 47):

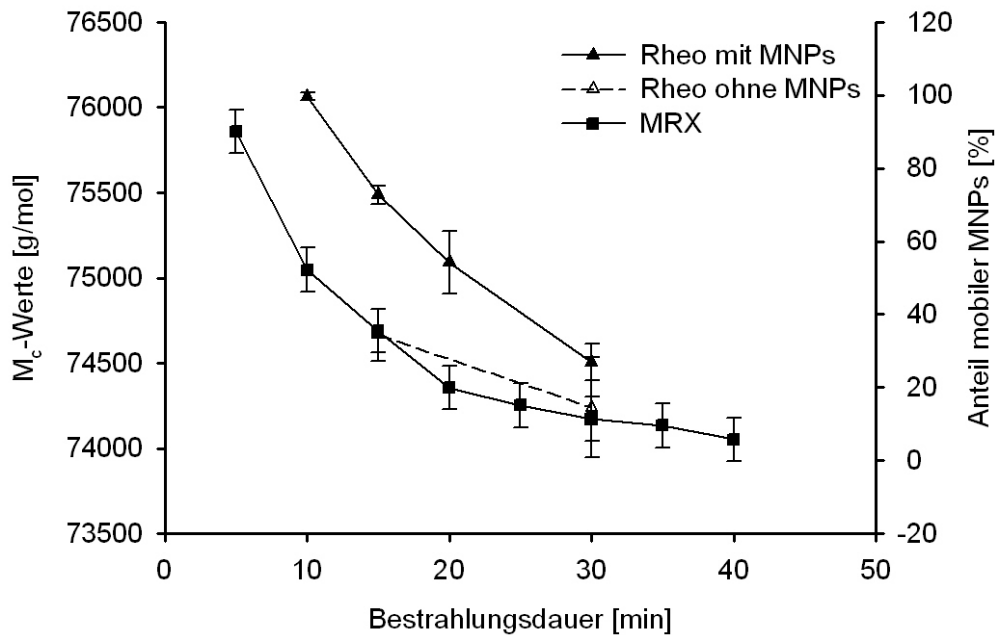


Abb. 47: Vergleich der \overline{M}_c -Werte aus Rheologiemessungen von Hydrogelen mit MNPs (\blacktriangle) und ohne MNPs (\triangle) mit dem Anteil an mobilen MNPs (\blacksquare) mit zunehmender Bestrahlungsdauer

Die Abnahme der \overline{M}_c -Werte mit Zunahme der Belichtungsdauer zeigt von 10 bis 30 Minuten einen ähnlich starken Abfall wie der prozentuale Anteil der mobilen MNPs. Für die Belichtungsdauer von 5 Minuten konnten keine Werte mit dem Rheometer aufgenommen werden, da die Proben zu labil sind und nicht auf die Messplatte aufgebracht werden konnten. Die Abnahme des \overline{M}_c -Wertes bewegt sich nur in einem geringen Bereich zwischen 76000 g/mol und 74400 g/mol. In diesem Bereich liegen auch die Werte der HESHEMA-Probe ohne MNPs, die zwischen 74700 g/mol und 74300 g/mol variieren. Die geringeren Speichermodul und die daraus resultierenden \overline{M}_c -Werte können durch die braune Farbe der MNP-Dispersion erklärt werden, da diese die Quantenausbeute zur Photovernetzung verringert.

Da sich die Form der Kurven ähnelt, lässt sich feststellen, dass die Magnetrelaxometrie ähnliche Verläufe der Messwerte wie die Rheologie liefert.

Die in der Rheologie schon eingesetzten Proben ergeben in den Quellungsmessungen folgende Abhängigkeit der \overline{M}_c -Werte von der Belichtungsdauer (Abb. 48). Der Verlauf der \overline{M}_c -Werte aus den Quellungsmessungen der Gele mit MNPs entspricht in der Form der Kurve noch besser der Abnahme des Anteils an mobilen MNPs als die Rheologiemessungen. Die \overline{M}_c -Werte nehmen von 175000 g/mol nach 10 Minuten auf 92000 g/mol nach 30 Minuten UV-Bestrahlung ab. Die \overline{M}_c -Werte der Proben ohne MNPs zeigen für kurze Belichtungszeiten (15 Minuten) deutlich kleinere Werte mit 91000 g/mol, mit Zunahme der Belichtungsdauer auf 30 Minuten nähern sich die Werte mit 89000 g/mol denen der mit MNPs versetzten Proben an.

Auch bei diesen Messwerten zeigt sich der Einfluss der Beladung mit MNPs auf die Vernetzung, da dadurch mechanisch wenig stabile Gele entstehen, die stärker quellen als die Vergleichssubstanz ohne MNPs und sich somit größere Werte für \overline{M}_c ergeben.

Der \overline{M}_c -Vergleich der Daten aus Quellungsmessungen und Rheologie zeigt, dass diese Messwerte, wie auch die für die Proben, die im Kapitel 3.3.2 vorgestellt wurden, sehr stark voneinander abweichen. Diese Abweichungen lassen sich, wie auch in Kapitel 3.3.2, dadurch begründen, dass bei der Rheologie im Vergleich zu den Quellungsmessungen auch Verschlaufungen als Netzknoten in Betracht kommen, dass die eingesetzten Konstanten zur Auswertung Annahmen sind und dass die Quellungsmessungen Temperaturschwankungen unterliegen können. Erschwerend bei diesen Auswertungen kommt hinzu, dass die MNPs

vom Hydrogel eingeschlossen werden und die rheologischen Eigenschaften beeinflussen. Dieser Einfluss kann mit den vorliegenden Daten nicht quantifiziert werden.

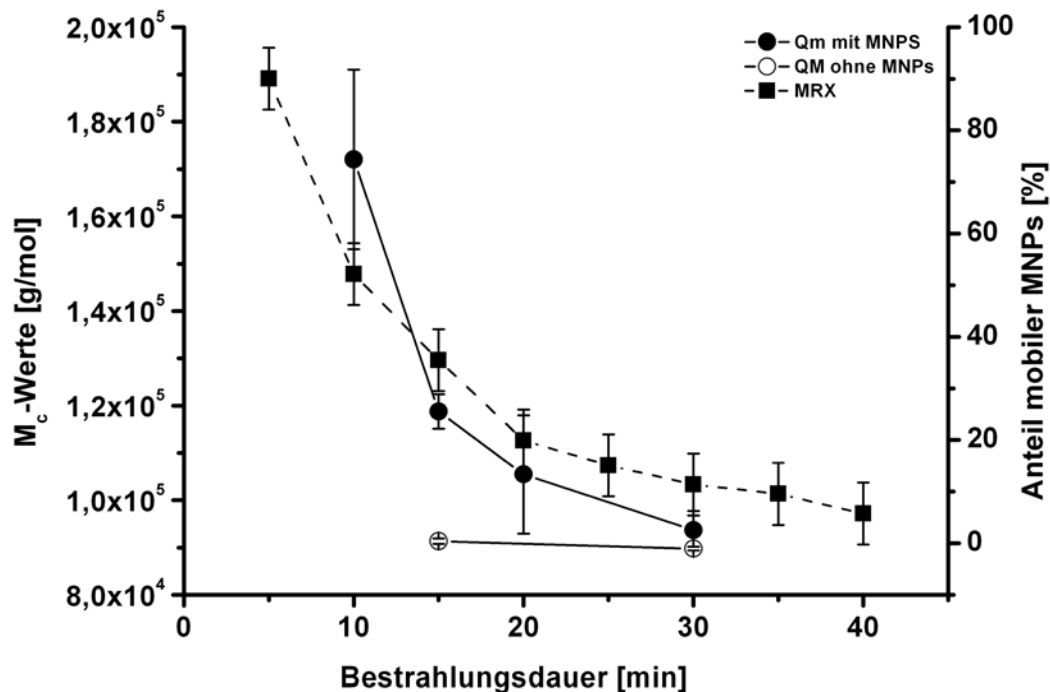


Abb. 48: Vergleich der \overline{M}_c aus Quellungsmessungen (Qm) von Hydrogelen mit (●) und ohne MNPs (○) mit dem prozentualen Anteil der mobilen MNPs (■) mit zunehmender UV-Bestrahlungsdauer

Es müssen daher in Zukunft noch weitere Untersuchungen erfolgen, bei denen systematisch die Konzentration, Größe, Größenverteilung und chemische Oberflächenaktivität der MNPs variiert wird. Zusätzlich zu diesen experimentellen Arbeiten müssen auch theoretische erfolgen, um neue Modelle zur Bestimmung der Hydrogeleigenschaften mittels MNP-Sonden zu erarbeiten.

Es lässt sich festhalten, dass die Magnetrelaxometrie im Vergleich mit den beiden Standardcharakterisierungsmethoden für Hydrogele eine ähnliche/gleiche Abhängigkeit der Hydrogeleigenschaften mit zunehmender UV-Belichtungsdauer zeigt. Die Theorie und Experimente zu dieser Methode müssen allerdings noch vertieft werden, um direkt vergleichbare und quantitative Werte zu erhalten. Die großen Vorteile dieser Methode sind die schnelle Messzeit, die große Anzahl der Einzelmessung und die geringe Standardabweichung sowie die Unabhängigkeit der Messung von der Gelbeschaffenheit, da sowohl Lösungen als auch feste Gele gemessen werden können. Ein weiterer Vorteil ist die Messung von Hydrogeleigenschaften bei geringen Belichtungszeiten und höheren

Belichtungsdauern, da diese wegen der geringen Unterschiede mit den klassischen Methoden Quellungs- und Rheologiemessungen auf Grund von Messungenauigkeiten nicht erfasst werden können.

3.3.4 Abbaubarkeit von HESHEMA-Hydrogelen

Um die Abbaubarkeit der HESHEMA-Hydrogele zu untersuchen, wurden erste Quellungsmessungen mit Hydrogelen in Gegenwart von Enzymen durchgeführt. Die Gelzylinder wurden nach dem üblichen Verfahren mit HESHEMA (HEMA-CI/HES: 25/100, DMAP/HEMA-CI: 1,34, Herstellungsdauer: 43,5 h, \overline{M}_w : 170000 g/mol, DS: 0,08) hergestellt, nur mit dem Unterschied, dass als Lösungsmittel bei den unbeladenen Hydrogelen Sörensenpuffer (pH 7,4) und bei den beladenen Hydrogelen Sörensenpuffer (pH 7,4) mit 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (α -Amylase) (3,9 IU/mL) verwendet wurde. Die Hydrogele wurden nach 30minütiger UV-Bestrahlung in Sörensenpuffer (pH 7,4) mit 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (α -Amylase) (3,9 IU/mL) bei 37 °C im Wasserbad gelagert und mittels der Filtermethode gravimetrisch untersucht. Dabei ergibt sich folgender Verlauf der \overline{M}_c -Werte über die Zeit (Abb. 49).

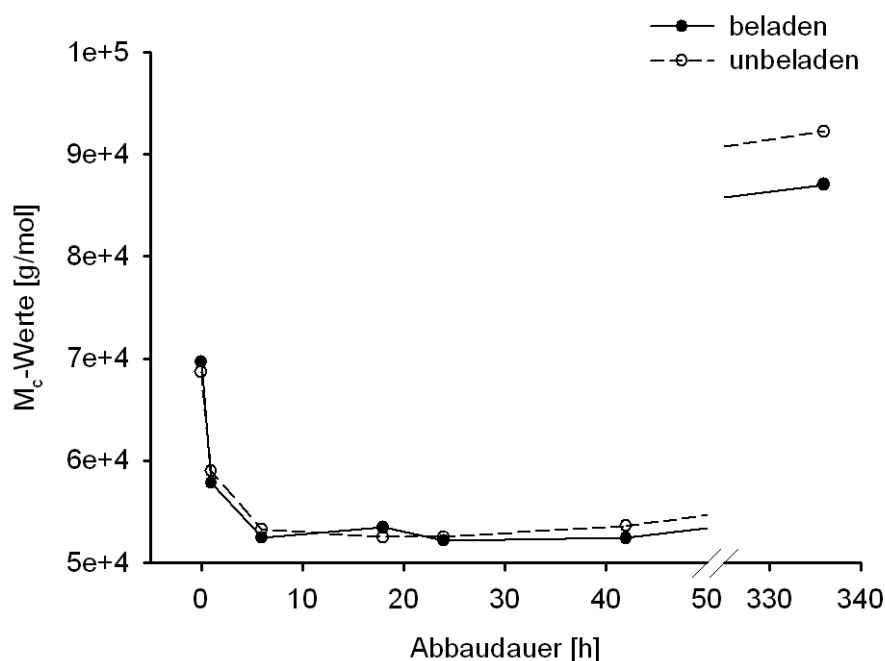


Abb. 49: \overline{M}_c -Veränderung durch Lagerung der beladenen (●) und unbeladenen (○) HESHEMA-Hydrogele in Sörensenpuffer mit 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (α -Amylase)

Die beiden Proben verhalten sich gleich bzw. sehr ähnlich. Der \overline{M}_c -Wert nimmt in der ersten Stunde ab, was an überschüssiger Flüssigkeit auf dem Hydrogelkörper bei der ersten Messung liegen kann. Innerhalb von 42 Stunden ändern sich die \overline{M}_c -Werte bei beiden Proben nicht. Allerdings erfolgt in dem Zeitraum von 42 h auf 336 h ein Abbau des Hydrogels, was in einer erhöhten Wasseraufnahme resultiert, wodurch sich größere \overline{M}_c -Werte ergeben. Die beladene Probe zeigt kleinere \overline{M}_c -Werte als die unbeladene Probe. Es ist möglich, dass die Bedingungen der Hydrogelbildung zur Schädigung des Enzyms geführt haben. Da dieses jedoch im Hydrogel verblieben ist, ist der Konzentrationsgradient der Enzyme geringer als bei der Vergleichsprobe ohne Enzym. Die Diffusion in das Gel und dadurch der Abbau der Hydrogelmatrix erfolgen langsamer. Generell lässt sich aber feststellen, dass die HESHEMA-Hydrogele durch 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (α -Amylase) abgebaut werden, aber nach 336 h noch nicht komplett gelöst sind.

3.3.5 Freisetzung aus HESHEMA-Hydrogelen

Die Arbeiten zur Freisetzung aus HESHEMA-Hydrogelen wurden von den Kooperationspartnern aus der Pharmazeutischen Technologie der TU Braunschweig durchgeführt. Die Schwerpunkte dieser Untersuchungen werden in diesem Kapitel kurz dargestellt. Zu ausführlicheren Informationen sei auf die Dissertationen von Frau K. Scheibe und Frau A. Schwoerer verwiesen.

Es lassen sich Proteine und FITC-Dextrane in Hydrogele aus HESHEMA einschließen. FITC-Dextrane sind Dextrane, die mit dem Fluoreszenzlabel Fluorescein-isothiocyanat markiert sind. Das Immobilisieren kann in Hydrogelzylindern, ähnlich den Probenkörpern der MRX-Untersuchungen, oder über das in Kapitel 2.1.1 beschriebene wässrigen Zwei-Phasen System in Mikrogelpartikeln erfolgen. Als Proteine wurden schon Lysozym und BMP-2 (bone morphogenetic proteins) immobilisiert und freigesetzt²³. Mit Fluorescein-isothiocyanat fluoreszenzmarkiertem Lysozym (FITC-Lysozym) zeigt sich bei der Freisetzung eine deutliche Abhängigkeit der Freisetzungsgeschwindigkeit vom Substitutionsgrad der zur Herstellung des Hydrogels verwendeten HESHEMA (Abb. 50).

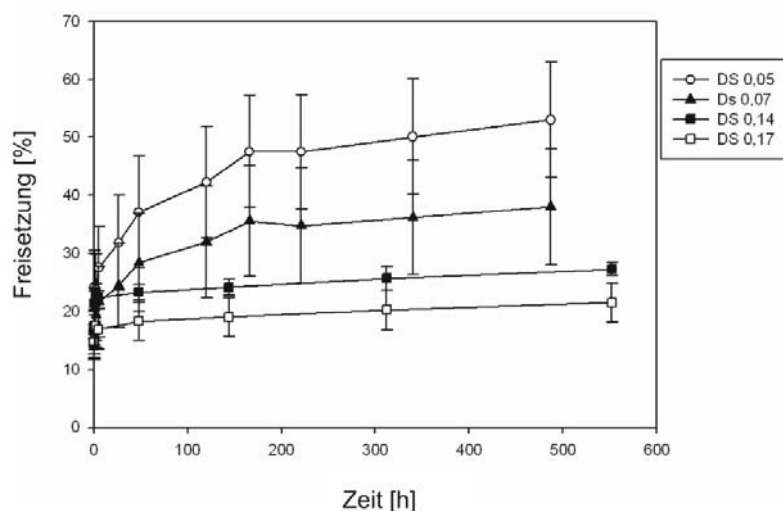


Abb. 50: Freisetzung [%] von Fluorescein-isothiocyanat fluoreszenzmarkiertem Lysozym aus Mikrosphären, die aus HESHEMA-Derivaten mit unterschiedlichem DS ($\circ = 0,05$; $\blacktriangle = 0,07$; $\blacksquare = 0,14$; $\square = 0,17$) hergestellt wurden, über die Zeit [d]¹⁰⁴

Die Proteinfreisetzung erfolgt aus Hydrogelen mit geringem Substitutionsgrad sowohl bei den Mikrosphären (gezeigt in Abb. 50) als auch bei den Hydrogelzylindern schneller als bei denen mit hohen Substitutionsgraden. Dabei erfolgt die Freisetzung in allen Polymeransätzen mit einem „burst-release“, d.h. sehr viel Protein wird in sehr kurzer Zeit freigesetzt, dem eine länger andauernde gleichmäßige Freisetzung folgt. Unter den Untersuchungsbedingungen (pH 7, Phosphatpuffer, 37°C) zeigen die Hydrogele Freisetungsverhalten mit FITC-Lysozym, die auf die Kombination aus diffusionsgesteuerter Freisetzung und Abbau des Hydrogelgerüsts hindeutet¹⁴⁷. Bei diesen Untersuchungen wurden HESHEMA-Polymere verwendet, die aus der jeweiligen Phase der Herstellung stammen, in der die Nebenreaktionen noch nicht so ausgeprägt sind. Neben dem FITC-Lysozym wurden durch FITC-Dextrane mit unterschiedlichen Molekulargewichten unterschiedlich große Gäste in HESHEMA-Hydrogele eingebunden, um den geplanten Einsatz für die spätere Anwendung mit unterschiedlich großen Antikörperfragmenten zu simulieren. Die Beladung der Mikrosphären mit den unterschiedlich großen FITC-Dextranen und deren Freisetzung lässt sich, wie beim FITC-Lysozym über die Fluoreszenz verfolgen (Abb. 51). Dabei zeigt sich, dass die kleineren Moleküle schneller freigesetzt werden als größere, was sich durch die bessere Diffusion von kleineren Molekülen erklärt¹⁰⁴. Es zeigt sich auch bei diesen Gastmolekülen ein zweiphasiges Freisetungsverhalten. Das Freisetungsverhalten der eingebundenen Gastmoleküle wird signifikant von der Phasenseparation, die während der Hydrogelbildung auftritt (Abb. 36), beeinflusst.

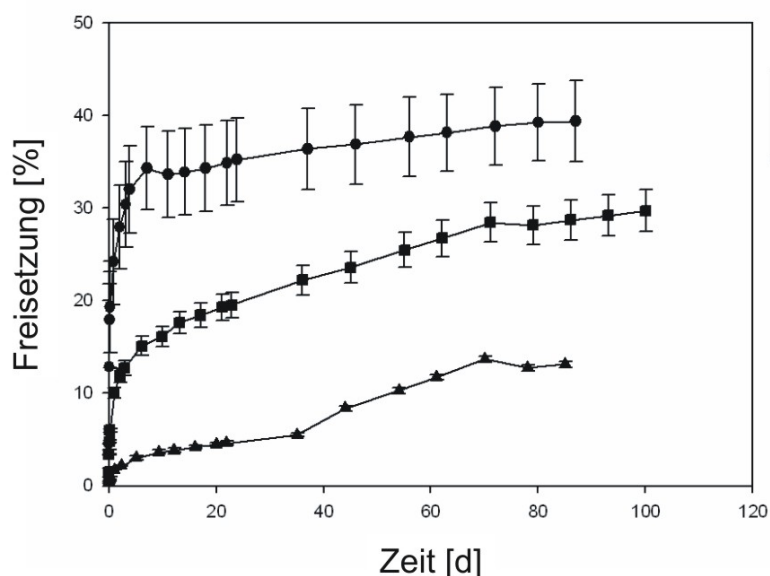


Abb. 51: Freisetzung [%] von FITC-Dextranen unterschiedlicher Größe (● FD 20 = 20 kDa; ■ FD 70 = 70 kDa; ▲ FD 500 = 500 kDa) aus Mikrosphären, die aus HESHEMA mit einem DS von 0,05 hergestellt wurden, über die Freisetzezeit [d]¹⁰⁴

In der ersten Phase der Freisetzung aus HESHEMA-Hydrogelen kommt es zu einer sehr schnellen initialen Freisetzung, möglicherweise durch Diffusion aus den Kanälen, der dann eine sehr langsame Freisetzung aus der Hydrogelmatrix selber folgt¹⁰⁴. Vorangegangene Arbeiten von Franssen et al.¹⁰³ an vergleichbaren Systemen von mit HEMA-Gruppen modifizierten Dextranen zeigen hingegen einen einphasigen Verlauf. Das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten der Polysaccharide Dextran und Hydroxyethylstärke resultiert somit in Hydrogelen mit unterschiedlichen Phasenseparationsverhalten und unterschiedlichen Freisetzungskurven.

Um die Freisetzung vor allem durch Abbau der Hydrogelmatrix zu erreichen, wurden Studien bei pH 9,6 durchgeführt. Durch das basische Medium wird der Abbau des Hydrogels deutlich beschleunigt. Die hydrolytisch labile Carbonatestergruppe, die die vernetzbare Methacrylatgruppe mit dem HES-Rückgrat verbindet, lässt sich bei höheren pH-Werten basenkatalysiert spalten. Innerhalb von 200 Stunden erfolgte die Freisetzung von FITC-Dextranen in Abhängigkeit von Substitutionsgrad und Molekülgröße der Gastmoleküle. Da bei niedrigerem DS weniger Vernetzungspunkte vorliegen, erfolgt der Abbau der Hydrogele mit geringem DS schneller und somit auch die Freisetzung der Gastmoleküle.

Neben der chemischen Hydrolyse lässt sich der Abbau auch durch den Einsatz entsprechender Enzyme forcieren (s. Kapitel 3.3.4). Daher wurde der Einfluss der 1,4- α -D-Glucan-

Glucanohydrolase (α -Amylase) (EC 3.2.1) auf die Freisetzung in konvertiertem humanem Serum als Akzeptormedium untersucht. Dabei zeigt sich, dass Mikrosphären in Serum FITC-Dextrane schneller freisetzen als im Phosphatpuffer ohne 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (α -Amylase). Durch das Enzym wird die Hydrogelmatrix abgebaut, wodurch der Anteil der großen Poren zunimmt und die Diffusion der eingeschlossenen Gastsubstanzen erleichtert wird.

Zusammenfassend lässt sich zu diesen Untersuchungen feststellen, dass mit HESHEMA-Hydrogelen ein Material entwickelt worden ist, mit dem Proteine immobilisiert und wieder frei gesetzt werden können. Die Freisetzung erfolgt zweiphasig mit einem sehr schnellen „burst-release“ gefolgt von einer langsameren Freisetzung. Durch Enzyme und chemische Hydrolyse kann die Freisetzung beschleunigt werden.

3.4 Fazit zu HESHEMA

Das verwendete Herstellungsverfahren über die CDI-Aktivierung von Hydroxyethylmethacrylat ergibt HESHEMA-Derivate, deren Eigenschaften von der Güte des eingesetzten HEMA-Cl, dem relativen Anteil des HEMA-Cl, der Reaktionszeit und in geringerem Maße von der verwendeten DMAP-Konzentration abhängen. Bei der Herstellung ergibt sich ein dreiphasiger Verlauf der Molekulargewichte des Produkts, der wahrscheinlich durch Nebenreaktionen hervorgerufen wird. Die Vielzahl an Einflussfaktoren erschwert eine verlässliche und reproduzierbare Synthese von großen Polymermengen. Bei HESHEMA-Proben mit höheren Substitutionsgraden als 0,2 ist die Wasserlöslichkeit gering, was den Einsatz als Basismaterial für DDS für Pharmaproteine ausschließt. Zur weiteren Verwendung und zur weiteren Untersuchung der HESHEMA-Chargen muss daher neben dem DS auch das jeweilige Molekulargewicht und die Reaktionszeit, d.h. die Phase der Substitutionsreaktion und damit das Ausmaß der Nebenreaktionen angegeben werden. Die hergestellten wasserlöslichen HESHEMA-Polymere zeigen eine gute enzymatische Abbaubarkeit.

Auch bei den Eigenschaften der Hydrogele zeigt sich eine Abhängigkeit von dem Molekulargewicht, dem DS und aus welcher Phase der Substitutionsreaktion der HESHEMA-Herstellung das verwendete HESHEMA stammt. Je geringer der DS und je größer das Molekulargewicht der Polymere ist, umso größere Maschenweiten ($\overline{M_c}$ -Werte) werden erhalten. Weitere Einflussgrößen sind die verwendete Form der Hydrogelproben (Scheibe vs.

Zylinder) und die Belichtungsdauer (je länger bestrahlt wird, umso geringer ist das \overline{M}_c und umso geringer ist die Maschenweite).

Diese vielen Einflussgrößen auf die Geleigenschaften sprechen dafür, dass die verwendete HESHEMA nicht in allen Punkten das optimale Präpolymer für die Entwicklung von DDS darstellt. Im folgenden Kapitel sollen deshalb alternative HES-Derivate vorgestellt und untersucht werden.

4. Weitere vernetzbare HES-Derivate

Neben HESHEMA sind auch andere wasserlösliche und vernetzbare Derivate aus Hydroxyethylstärke synthetisierbar. Dabei lassen sich Variationen der Spacerlänge, also dem Abstand zwischen der vernetzbaren Gruppe und dem Polymerrückgrat, eine Variation der Anbindung der vernetzbaren Gruppe sowie der vernetzbaren Gruppe selbst durchführen. Die Variation der Spacerlänge wurde über die unterschiedliche Anzahl Ethylenoxideinheiten in den Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat-Derivaten (HESPEGMA) verwirklicht. Bei den Hydroxyethylstärke-Methacrylat-Derivaten (HESMA) wurde neben der Reduktion der Spacerlänge um eine Ethylenoxideinheit auch die Art der Anbindung variiert. Anstatt einer Carbonatesterfunktion erfolgte die Anbindung des Substituenten über eine Estergruppe. Um die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Systeme zu erhalten, wurde auf eine Variation der vernetzbaren Gruppe, der Methacrylatgruppe, verzichtet. Diese vernetzbaren HES-Derivate sollen im Folgenden vorgestellt werden.

4.1 HESPEGMA

Im Falle der Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat-Derivate (HESPEGMA) (Abb. 52) sind zusätzliche Ethylenoxideinheiten zwischen der vernetzbaren Methacrylatgruppe und dem Carbonatester an dem Hydroxyethylstärkerückgrat eingebracht.

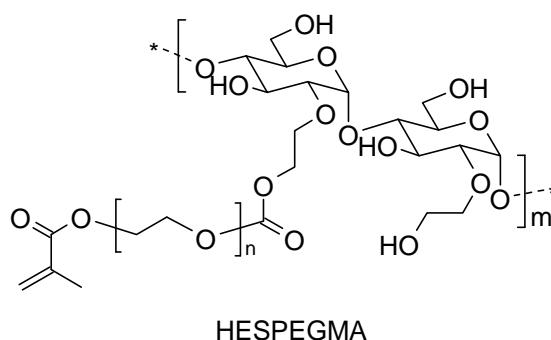


Abb. 52: Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat (HESPEGMA)

Durch das Einbringen wasserlöslicher Funktionen wie den Ethylenoxidgruppen soll zum einen die Wasserlöslichkeit der Polymere erhöht werden, was in einer Änderung des Phasenseparationsverhaltens resultieren sollte. Zum anderen soll durch den größeren Abstand der Vernetzungsfunktion vom Polymerrückgrat deren Beweglichkeit und Zugänglichkeit

verbessert werden, um dichtere Maschenweiten bei den zu bildenden Hydrogelen zu erreichen.

4.1.1 Synthese von HESPEGMA

Bei der Synthese von Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat-Derivaten (HESPEGMA) wird eine ähnliche Syntheseroute verfolgt wie bei der Herstellung von HESHEMA. Zunächst wird Polyethylenglycolmethacrylat (PEGMA) mit Carbonyldiimidazol (CDI) umgesetzt. Dabei entsteht das Polyethylenglycolmethacrylatcarbonylimidazol (PEGMA-CI) (Abb. 53).

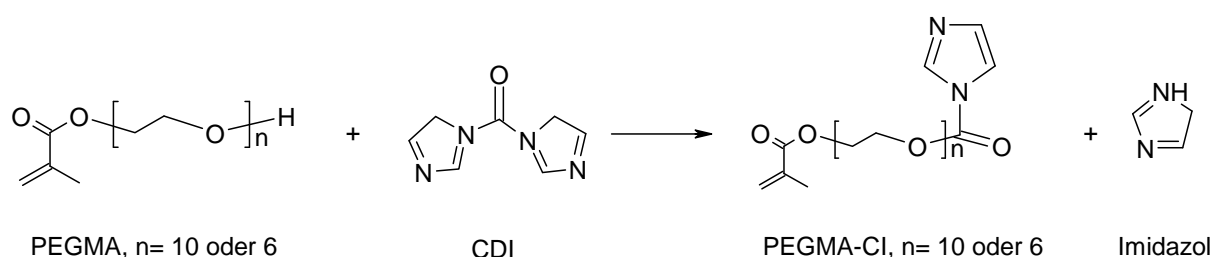


Abb. 53: Aktivierung von Polyethylenglycolmethacrylat (PEGMA) mit unterschiedlicher Anzahl von n Ethylenglycoleinheiten ($n=10$ oder 6) mit Carbonyldiimidazol (CDI) zu Polyethylenglycolmethacrylatcarbonylimidazol (PEGMA-CI), als Nebenprodukt Imidazol

Dieser durch das CDI aktivierte Substituent lässt sich in unterschiedlichen Verhältnissen mit Hydroxyethylstärke (HES) zu Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylaten (HESPEGMA) (Abb. 54) umsetzen.

Durch Variation der Anzahl (n) der Ethylenglycoleinheiten zwischen der Hydroxy- und der Methacrylatfunktion lassen sich somit sehr einfach unterschiedliche Substituenten herstellen. In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche Polyethylenglycolmethacrylate mit $n=6$ und $n=10$ verwendet¹. Dabei ergab ein molares Verhältnis HES:PEGMA-CI von 5:1 HESPEGMA-Derivate, die wasserlöslich und zu Hydrogelen vernetzbar sind. Des Weiteren wurden Verhältnisse HES:PEGMA-CI von 2:1, 1:1 und zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit erneut ein Verhältnis 2:1 getestet. Die dabei entstandenen HESPEGMA-Derivate sind allerdings nicht vollständig wasserlöslich und scheiden somit als Basismaterial eines DDS für Pharmaproteine aus. Andere molare Verhältnisse wurden nicht weiter verfolgt.

¹ Die Anzahl (n) der Ethylenoxideinheiten ist gleichzusetzen mit dem Polymerisationsgrad der Polyethylenoxidmethacrylate.

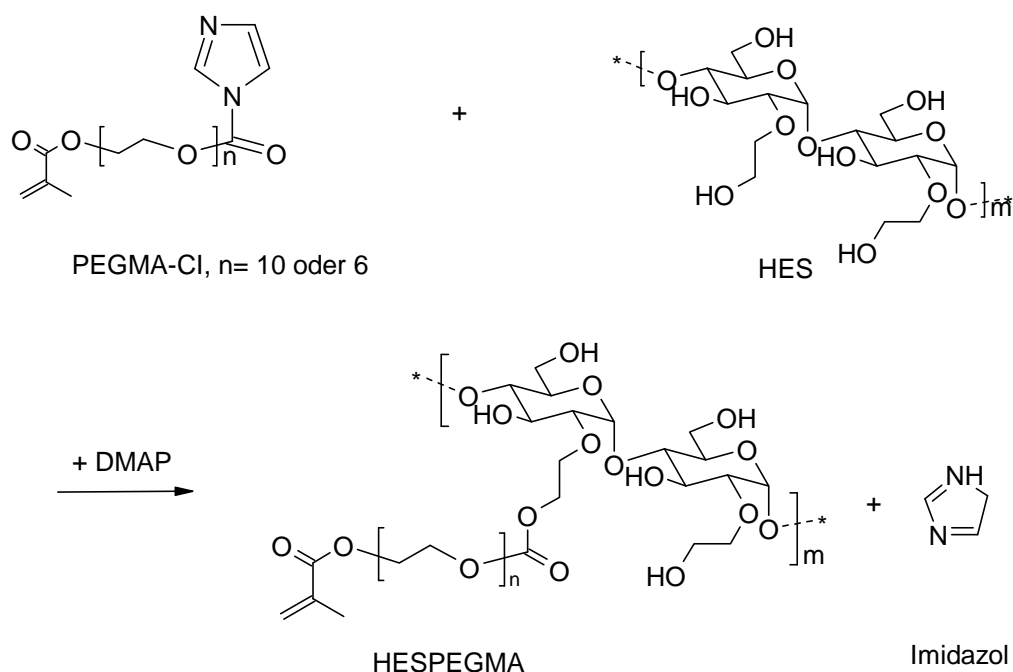


Abb. 54: Synthese von Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat (HESPEGMA) über CDI-Kupplung von Polyethylenglycolmethacrylatcarbonylimidazol (PEGMA-Cl) mit unterschiedlicher Anzahl von n Ethylenglycoleinheiten (n=10 oder 6) mit Hydroxyethylstärke (HES), als Nebenprodukt Imidazol

4.1.2 Charakterisierung von HESPEGMA

Die Charakterisierung der HESPEGMA-Derivate erfolgt mittels NMR- und GPC-Untersuchungen. Bei der ^1H -NMR-Untersuchungen von HESPEGMA-Proben ergeben sich NMR-Spektren, wie sie beispielhaft in Abb. 55 wiedergegeben sind.

Im ^1H -NMR Spektrum lassen sich sechs Signale eindeutig zuordnen. Die Vinylprotonen ergeben ein Signal bei 6,2 ppm (H_a) und ein Signal bei 5,8 ppm (H_a'). Die darauf folgenden drei Signale lassen sich den H_1 -Protonen (C-2 OH substituiert und nicht substituiert) des Stärkerrückgrats der Hydroxyethylstärke zuordnen. Die Multipletts zwischen 4,7 ppm und 2,8 ppm ergeben sich aus den Alkylprotonen des Substituenten, die Ethylenprotonen des Hydroxyethylsubstituenten und den übrigen Protonen des Stärkerrückgrates zusammen und lassen sich somit nicht separat betrachten. Ein Multiplett bei 2,0 ppm (H_b) lässt sich eindeutig den drei Protonen der Methylgruppe des Methacrylatsubstituenten zuordnen.

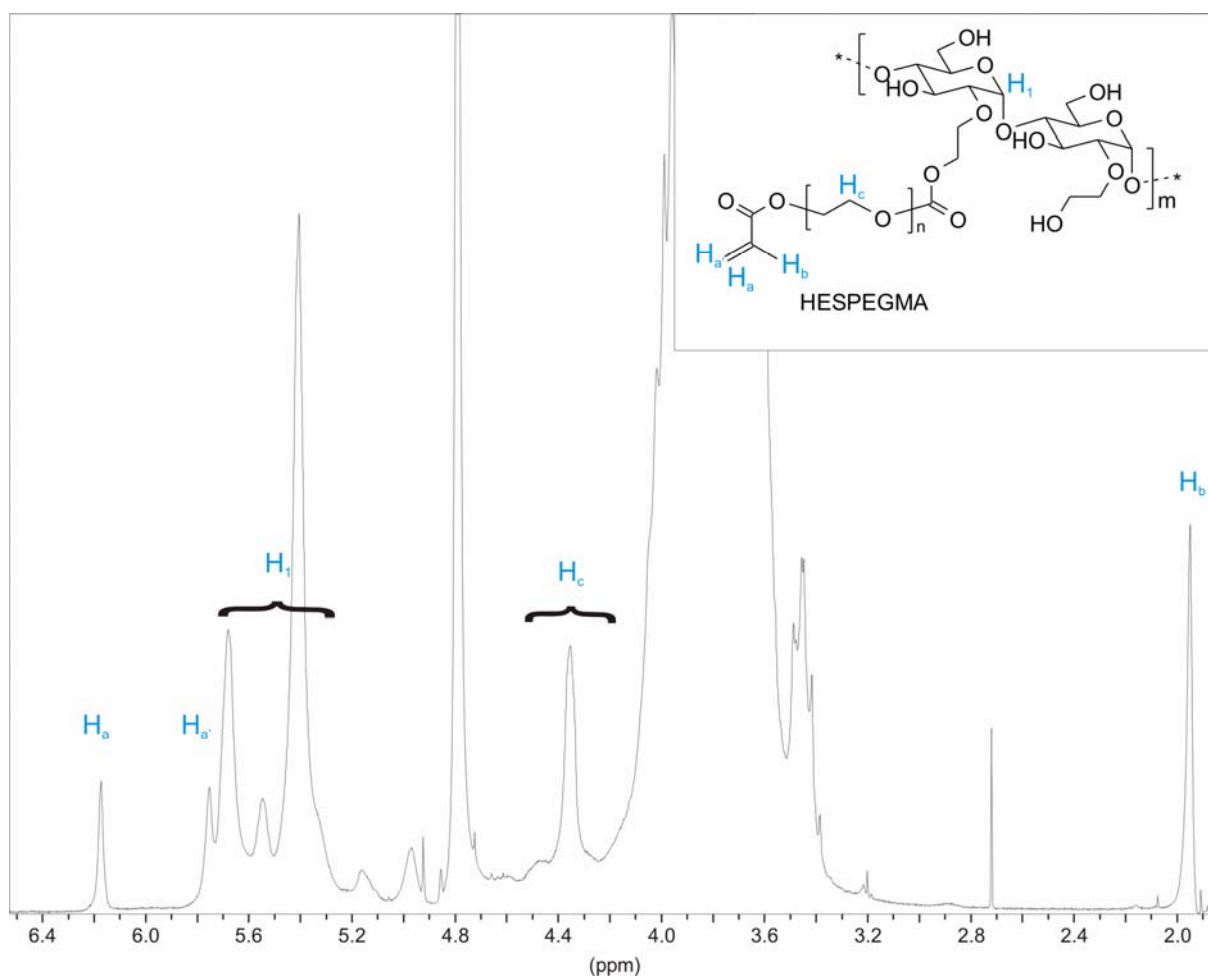


Abb. 55: ^1H -NMR Spektrum von HESPEGMA ($n=10$) in D_2O (300 MHz)

Bei der Bestimmung des Substitutionsgrades erfolgt die Bestimmung analog zu der DS-Bestimmung bei HESHEMA nach Gl. 38, da sich bei diesen Proben ebenfalls die Vinylprotonen des Substituenten von den H_1 -Protonen der Hydroxyethylstärke abgrenzen lassen.

$$DS = \frac{I_a}{\sum I_{H^1}} \quad (38)$$

Wenn das Signal des einen Vinylprotons bei 6,2 ppm (H_a) gleich eins gesetzt wird, sollte das Signal der Methylgruppe (H_b) gleich drei sein. Die Abweichung von drei wird prozentual auf den DS umgerechnet und gibt somit den Fehler der DS-Bestimmung wieder.

Die zwei Probenreihen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, unterscheiden sich in der Länge des Ethylenglycolspacers, da Polyethylenglycolmethacrylate mit $n=10$ und $n=6$ eingesetzt wurden. Zur einfacheren Handhabung werden diese im Weiteren mit HESPEG10MA und HESPEG6MA abgekürzt. Dabei ergeben sich folgende Verläufe des DS gegenüber der Reaktionszeit (Abb. 56).

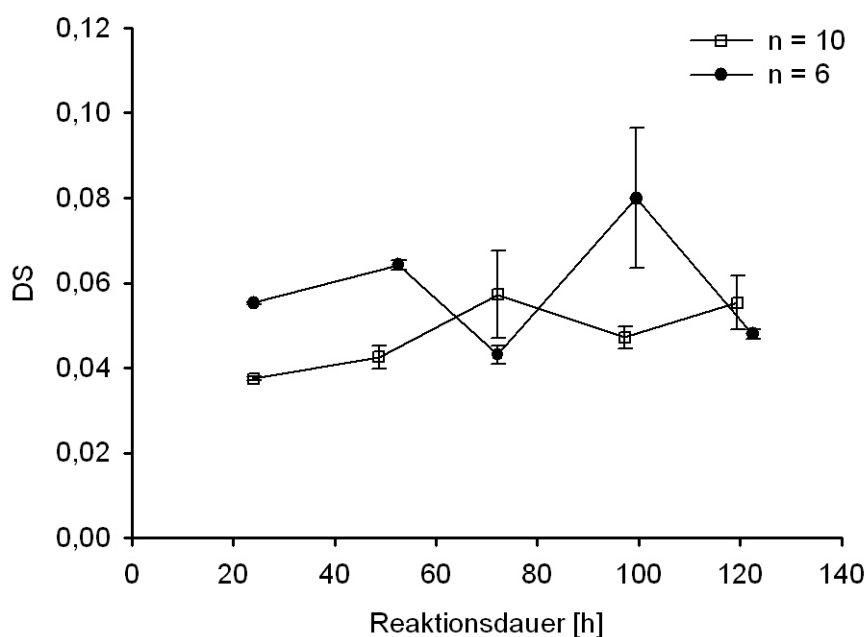


Abb. 56: DS-Verlauf von HESPEGMA-Ansätzen (HES:PEGMA-CI 5:1) mit unterschiedlicher Anzahl an Ethylglycolspacern (n=10, n=6) mit zunehmender Reaktionsdauer

Bei diesen beiden Ansätzen wurde das gleiche molare Verhältnis von HES zu PEGMA-CI mit 5:1 eingesetzt. Bei den HESPEG6MA-Proben nimmt der DS zunächst nach 48 h auf 0,06 zu, sinkt dann nach 72 h auf 0,04, steigt dann nach 100 h wieder an auf 0,08 mit einer großen Messunsicherheit von $\pm 0,01$ und nimmt dann nach 120 h wieder ab auf einen DS-Wert von 0,05. Die DS-Werte der HESPEG10MA-Probenreihe steigen gleichmäßig von 0,04 nach 24 h auf 0,05 nach 120 h an. Die HESPEG6MA-Polymere weisen in den ersten 53 h einen größeren DS als die HESPEG10MA-Polymere auf. Durch die geringere Größe sind die PEGMACI mit kürzerem Ethylenglycolspacer mobiler und werden somit schneller eingebaut. Nach 53 h ist dieser Trend nicht mehr eindeutig. Weitere Probenreihen zur Überprüfung dieser Ergebnisse sind erforderlich.

Bei der Molekulargewichtsbestimmung mittels GPC ergibt sich über die Reaktionsdauer folgender Verlauf für die HESPEGMA-Derivate (Abb. 57). Auch hier zeigt sich in den ersten 48 h der erwartete Verlauf. Das Molekulargewicht steigt von 110 000 g/mol nach 24h auf 190000 g/mol nach 48h an und die HESPEG10MA-Proben weisen ein minimal höheres Molekulargewicht als die HESPEG6MA-Proben auf. In den darauf folgenden Stunden nimmt im Fall des HESPEG6MA das Gewichtsmittel zunächst ab auf 135000 g/mol nach 72 h, steigt dann auf 270000 g/mol nach 100 h und nimmt daraufhin wieder ab auf 200000 g/mol nach 120 h. Die Gewichtsmittel der HESPEG10MA-Probenreihe nehmen nach 48 h stetig ab, so dass sich nach 120 h ein Wert von 137000 g/mol ergibt.

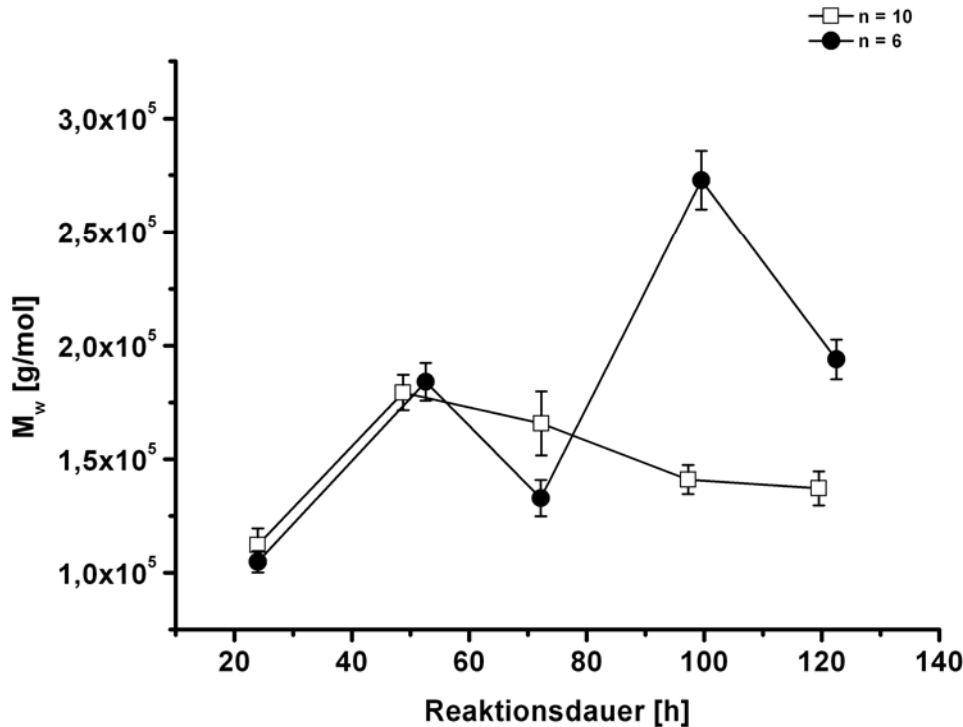


Abb. 57: \overline{M}_w -Verlauf von HESPEGMA-Ansätzen (HES:PEGMA-CI 5:1) mit unterschiedlicher Anzahl an Ethylglycolspacern (n=10, n=6) mit zunehmender Reaktionsdauer

Diese Verläufe unterscheiden sich sehr voneinander und können aus den unterschiedlichen Qualitäten der jeweiligen PEGMACI und Rest-CDI-Gehalte resultieren. Da nicht mehr Probenreihen vorliegen, lässt sich ein dreiphasiger Verlauf wie bei der HESHEMA nicht bestätigen. Trotz gewisser Probleme bei der genauen Einstellung des Substitutionsgrades werden Polymere erhalten, die für die Hydrogelherstellung sehr gut geeignet sind.

4.1.3 Hydrogele aus HESPEGMA

Aus den HESPEGMA-Derivaten werden Hydrogele in den schon bei HESHEMA-Hydrogelen gewählten Verhältnissen 10 wt.% in 0,01 wt.% Igarcure 2959 in Wasser hergestellt. Die Gele sind dabei farblos bis leicht opak, allerdings deutlich transparenter als die HESHEMA-Hydrogele.

Diese Gele werden mittels Quellungs- und Rheologiemessungen untersucht. Bei den Quellungsmessungen zeigt sich allerdings, dass die massenbezogene Quellungsrate q beider Probenreihen über längere Zeiträume nach einem Plateau geringer wird und sich nicht wie bei den HESHEMA-Hydrogelen ein konstantes Quellungsgleichgewicht einstellt (Abb. 58).

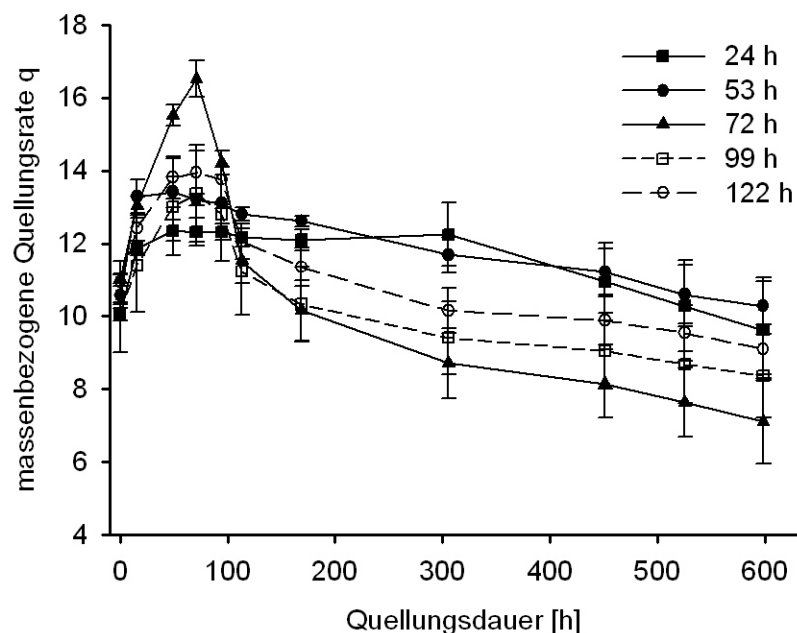


Abb. 58: Quellungsrate q vs. Quelldauer von Hydrogelen aus HESPEG6MA-Polymeren nach unterschiedlich langer Synthesereaktionsdauer

Dieses Verhalten spricht für einen Abbau des Hydrogels durch Trennen der Vernetzungspunkte mit zunehmender Lagerung in wässriger Umgebung. Durch die Verlängerung des Abstands der Methacrylatfunktion vom HES-Rückgrat und die zusätzlichen Ethylenoxideinheiten ist der hydrolytische Abbau einfacher als bei den HESHEMA-Proben mit dem kurzem Spacer, der nach der Nomenklatur der Polyethylenmethacrylate einem $n=1$ entspricht. Bei diesen Probenreihen wurden die Hydrogele jeweils 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Um diese Messungen hinsichtlich des mittleren Molekulargewichts \overline{M}_c zwischen zwei Vernetzungspunkten auswerten zu können, wird bei beiden Probenreihen zur Berechnung von \overline{M}_c die maximale Quellungsrate q bei ca. 100 h Quelldauer verwendet. Es ergeben sich somit folgende Verläufe der \overline{M}_c -Werte der beiden HESPEGMA-Hydrogele (Abb. 59).

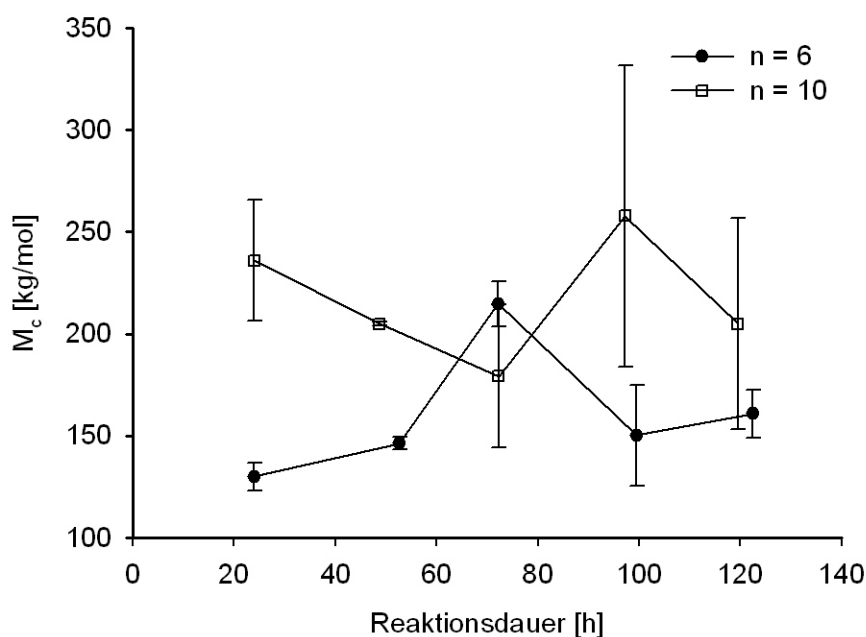


Abb. 59: \overline{M}_c -Werte aus Quellungsmessungen der HESPEGMA-Hydrogele mit unterschiedlicher Anzahl an Ethylglycolspacern (n=10, n=6) aus HESPEGMA-Polymeren nach unterschiedlicher Reaktionszeit

Beide Probenreihen weisen unterschiedliche Verläufe der \overline{M}_c -Werte über die Reaktionsdauer auf. Die HESPEG10MA-Reihe zeigt ein Minimum bei 72 h, die HESPEG6MA-Reihe ein Maximum bei 72 h. Da die Fehler jedoch sehr groß sind, ist ein eindeutiger Trend nicht zu bestimmen. Es lässt sich allerdings festhalten, dass die HESPEG10MA-Hydrogele größere \overline{M}_c -Werte aufweisen als die HESPEG6MA-Hydrogele. Bei den HESPEG10MA-Hydrogelen liegen die Werte für die \overline{M}_c -Werte im Bereich von 200 kg/mol, bei den HESPEG6MA-Hydrogelen lassen sich kleinere Werte von ca. 150 kg/mol bestimmen. Die HESPEGMA-Hydrogele weisen damit aber auch größere \overline{M}_c -Werte auf als die Hydrogele aus HESHEMA, die \overline{M}_c -Werte im Bereich von 80 kg/mol aufweisen. Dieser Unterschied entspricht den Erwartungen, da durch das Einbringen der Ethylenoxidspacer zum einen das Molekulargewicht des Substituenten und zum anderen die Beweglichkeit der vernetzbaren Methacrylatfunktion und die Hydrophilie des Substituenten erhöht wird. Die Erhöhung des Molekulargewichts des Substituenten wirkt dabei nur gering auf das jeweilige \overline{M}_c , da diese Unterschiede in einem vernachlässigbaren Bereich sind. Bei HESPEG6MA sind entsprechend sechs Ethylenoxid-Gruppen zusätzlich vorhanden, was einem Massenzuwachs von 264 g/mol entspricht. Bei HESPEG10MA entspricht dieser Zuwachs 440 g/mol. Durch die erhöhte

Beweglichkeit der vernetzbaren Gruppe ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine aktivierte Doppelbindung und eine weitere Doppelbindung zur Vernetzung treffen, größer, woraus kleinere Maschenweiten resultieren sollten. Dieser Effekt kommt bei Quellungsmessungen nicht zum tragen, da dabei der Trend in die entgegengesetzte Richtung weist. Als Hauptgrund für die Zunahme der \overline{M}_c -Werte mit der Ethylenoxidspaceranzahl ist die Zunahme der Hydrophilie zu nennen. Die verschiedenen HESPEGMA-Derivate weisen unterschiedliche Flory-Higgins-Polymer-Lösungsmittel-Wechselwirkungsparameter χ_1 auf, der in die Gleichung (8) zur Bestimmung der \overline{M}_c -Werte eingeht.

$$\overline{M}_c = \frac{Q^{5/3}V_1}{\left(\frac{1}{2} - 2\chi_1\right)^{\overline{\nu}}} \quad (8)$$

Durch das Einbringen der zusätzlichen Ethylenoxideinheiten wird die Tendenz des Hydrogels gesteigert, Wasser aufzunehmen, wodurch wiederum größere Maschen resultieren. Da durch Quellungsmessungen die Wasseraufnahme von Hydrogelen bestimmt wird, ergibt sich der beschriebene Verlauf und spiegelt dabei nur die Wasseraufnahmefähigkeit der unterschiedlichen HESPEGMA-Derivate wieder. Der Vergleich der \overline{M}_c -Werte aus Quellungsmessungen unterschiedlicher Polymere ohne die Kenntnisse der jeweiligen χ_1 -Parameter ist somit nicht exakt möglich, da die Interpretation der Messwerte stark fehlerbehaftet sind.

Um die These zu untersuchen, ob die Maschenweite mit Zunahme der Ethylenoxidspacer aufgrund der erhöhten Beweglichkeit abnimmt, müssen die Proben daher mittels Rheologie untersucht werden, da die Wasseraufnahme bei frisch hergestellten und gemessenen Proben vernachlässigbar ist.

Für die Rheologiemessungen wurden zwei Polymere ausgewählt. Das HESPEG10MA-Polymer mit einem DS von $0,05 \pm 0,001$ und einem M_w -Wert von 137200 g/mol entstand nach 120 h Reaktionsdauer. Das HESPEG6MA-Polymer weist einen DS von $0,04 \pm 0,003$ und einen M_w -Wert von 180000 g/mol auf und wurde mit einer Reaktionsdauer von 48 h hergestellt. Der Fokus lag bei diesem Vergleich auf den ähnlichen DS-Werten.

Die Auswertung nach \overline{M}_c durch die Rheologie erfolgte an Proben, die unmittelbar nach der Vernetzung gemessen wurden. Die HESPEG6MA-Probe zeigt nach 15 Minuten UV-Bestrahlung ein \overline{M}_c von 91000 g/mol mit einer Standardabweichung von 60 g/mol. Nach

30 Minuten UV-Bestrahlung zeigt dieses Material ein \overline{M}_c von 89000 g/mol mit einer Standardabweichung von 160 g/mol. Somit sind diese Werte nahezu konstant, wie es ebenso bei den Rheologiemessungen zur HESHEMA zu beobachten war.

Die HESPEG10MA-Probe wurde daraufhin nur nach 30 Minuten UV-Bestrahlung untersucht. Dabei weist das HESPEG10MA-Hydrogel ein \overline{M}_c von 68000 g/mol mit einer Standardabweichung von 210 g/mol auf.

Somit sind die \overline{M}_c -Werte für HESPEG10MA-Hydrogel kleiner als die Werte für die HESPEG6MA-Hydrogele, was auf kleinere Maschenweiten der HESPEG10MA-Hydrogele hindeutet. Somit widerspricht dieser Befund den Ergebnissen aus den Quellungsmessungen, bei denen längere Spacer größere Wasseraufnahmen und somit größere Maschenweiten bzw. \overline{M}_c -Werte ergaben. Allerdings unterstreichen diese Messergebnisse die vorherige Annahme, dass es mit Zunahme der Beweglichkeit der vernetzbaren Gruppe durch Verlängerung des Spacers zu dichteren Netzwerken kommt. Die HESPEG10MA-Hydrogele bilden somit dichtere Netzwerke aus als die HESPEG6MA-Hydrogele, aber nehmen durch das Quellen mehr Wasser auf, wodurch die Maschenweiten wiederum größer als die der HESPEG6MA-Hydrogele werden. Aus diesen Messergebnissen zeigt sich, dass der Vergleich von Messdaten aus unterschiedlichen Messverfahren wie Rheologie und Quellungsmessungen nur möglich ist, wenn die Einflussparameter wie unterschiedliche χ_1 -Parameter z.B. auf die Messgröße bei beiden Messverfahren bekannt sind.

4.1.4 Fazit zu HESPEGMA

Mit dem schon zur Herstellung von HESHEMA eingesetzten Verfahren, Methacrylatgruppen funktionalisierte Alkohole nach CDI-Aktivierung mit Hydroxyethylstärke zu koppeln, sind auch bei der Herstellung von HESPEGMA Polymere zugänglich, die sich zu Hydrogelen umsetzen lassen. Diese Polymere weisen eine deutlich bessere Wasserlöslichkeit auf, als die bisher verwendeten HESHEMA-Polymere.

Die Reaktion der CDI-aktivierten Alkohole mit Hydroxyethylstärke zeigt auch bei HESPEGMA einen nicht linearen Verlauf, da sich die DS- und M_w -Werte nicht linear entwickeln. Aufgrund der geringen Anzahl von HESPEGMA-Ansätzen lässt sich ein dreiphasiger Verlauf, wie bei der HESHEMA-Herstellung, nicht eindeutig belegen. Um Erkenntnisse zum Verlauf der Molekulargewichte und zum Reaktionsgeschehen während der

HESPEGMA-Herstellung zu erlangen, ist die Synthese weiterer HESPEGMA-Polymere notwendig.

Die Hydrogele, die sich aus den HESPEGMA-Polymeren herstellen lassen, lösen sich jedoch nach längerem Quellen (nach 100 h) in Wasser teilweise auf, was auf einen Abbau der Vernetzungspunkte hindeutet. In HESPEGMA scheint die Verlängerung der Spacer und die höhere Hydrophilie den Abbau des Carbonatesters durch hydrolytische Spaltung zu erleichtern und somit zu beschleunigen. Aufschluss über diesen Abbau könnten zukünftige Untersuchungen der Abbauprodukte mittels HPLC wie bei den Literaturbekannten dexHEMA-Hydrogelen liefern^{17, 25}.

Die Hydrogele zeigen mit Zunahme der Ethylenoxidspaceranzahl stärkere Vernetzungen und somit kleinere \overline{M}_c -Werte in den Rheologiemessungen. Dadurch erhöht sich allerdings auch die Hydrophilie der Hydrogele, was in größeren \overline{M}_c -Werten in den Quellungsmessungen resultiert. Durch die Erhöhung der Ethylenoxidspaceranzahl lassen sich somit stärker vernetzte Hydrogele herstellen, deren Wasseraufnahmefähigkeit mit Zunahme der Ethylenoxidspacer ebenfalls steigt.

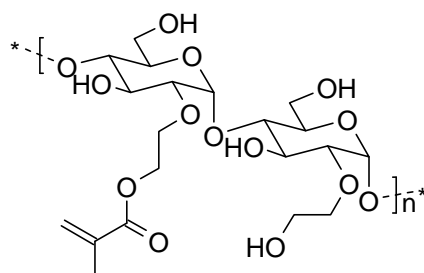
Ein eindeutiger linearer Zusammenhang zwischen den Materialeigenschaften der Polymere wie DS, Molekulargewicht oder Reaktionsdauer mit den Materialeigenschaften der Hydrogele lässt sich auch bei diesen Polymeren nicht erkennen, es ist somit ein Zusammenspiel dieser Größen auf die Geleigenschaften zu vermuten. Es müssen allerdings Untersuchungen an weiteren HESPEGMA-Derivaten erfolgen.

Da es bei der Herstellung der beiden Polymeren (HESHEMA und HESPEGMA) zu Problemen in der reproduzierbaren CDI-Aktivierung der Methacrylatfunktionalisierten Edukte kommt, sollte die Art der HES-Modifizierung vereinfacht werden. Diese Vereinfachung zur Modifizierung von HES mit einer vernetzbaren Methacrylatgruppe soll im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

4.2 HESMA

Bei dieser Modifizierung von Hydroxyethylstärke handelt es sich um das einfachste HES-Methacrylat-Derivat. Dabei wird Hydroxyethylstärke über eine Esterfunktion mit Methacrylsäure verbunden und es entsteht Hydroxyethylstärkemethacrylat (HESMA) (Abb. 60). Da die Anbindung über eine Esterfunktion erfolgt, sollte dieses Polymer aufgrund der

höheren Hydrolysebeständigkeit gegenüber der Carbonatesterbindung stabiler sein als die bisher vorgestellten HES-Derivate.



HESMA

Abb. 60: Hydroxyethylstärkemethacrylat (HESMA)

Im Falle von Dextran sind dexMA-Derivate stabiler als dexHEMA-Derivate¹⁷. Ob diese Beobachtung auch für HES-Derivate zutrifft, ist zu überprüfen, da HES ein anderes Löslichkeitsverhalten aufweist als Dextran.

4.2.1 Synthese von HESMA

Zur Synthese dieser HES-Derivate wird HES mit Glycidylmethacrylat (GMA) zu Hydroxyethylstärke-Methacrylat (HESMA) mit Glycidol (GDOL) als Nebenprodukt umgesetzt^{69, 148} (s.

Abb. 61).

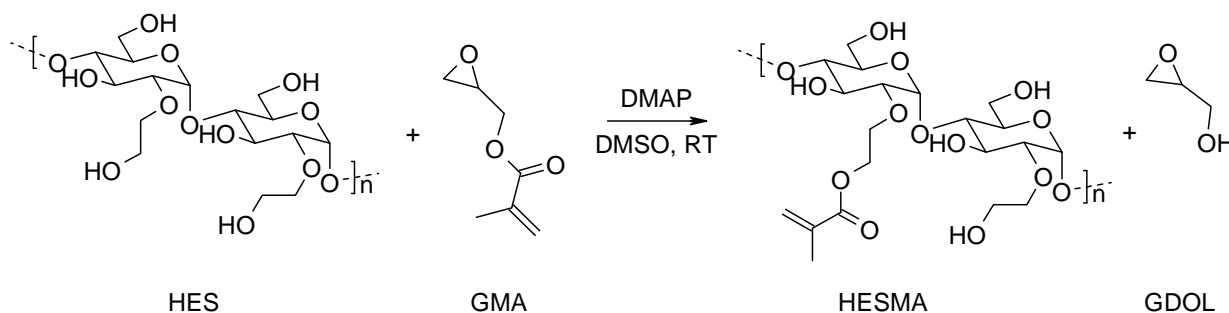


Abb. 61: Synthese von Hydroxyethylstärke-Methacrylat (HESMA) mit Glycidol (GDOL) als Nebenprodukt aus der Reaktion von Hydroxyethylstärke (HES) und Glycidylmethacrylat (GMA)

Untersuchungen von Van Dijk-Wolthuis et al. der Reaktion von Glycidylmethacrylat mit Dextran haben gezeigt, dass Glycidolat eine sehr gute Abgangsgruppe ist, die sich durch die Delokalisierungen der negativen Ladung auf zwei Sauerstoffatome stabilisiert (Abb. 62).

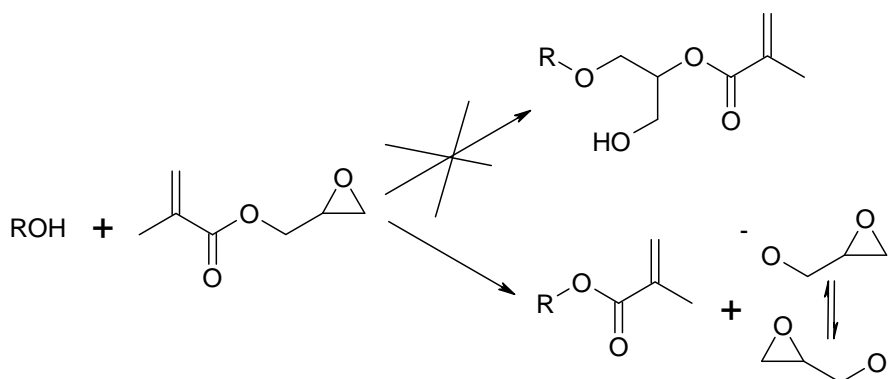


Abb. 62: Umsetzung von Glycidylmethacrylat mit Polysaccharid führt nicht zu dem erwarteten Ringöffnungsprodukt, sondern zu mit der Methacrylatgruppe über eine Esterbindung funktionalisiertem Polysaccharid, da Glycidol durch die Delokalisierung der negativen Ladung auf zwei Sauerstoffatome als sehr gute Abgangsgruppe fungiert.

Durch einfache Reaktion lassen sich Polysaccharide zu mit Methacrylatgruppen funktionalisierten Polymeren umsetzen. Die Kinetik dieser Reaktion lässt sich durch Probennahme nach unterschiedlichen Reaktionszeiten, gefolgt durch gleiche Aufarbeitungsmethoden, mittels Kern-Resonanz-Spektroskopie (NMR) und Gelpermeationschromatographie (GPC) verfolgen.

Die Zusammensetzung der HESMA-Derivate wurde neben der Reaktionsdauer durch das Verhältnis der Edukte HES zu GMA beeinflusst. Der große Vorteil dieser Reaktion gegenüber der CDI-Aktivierung von mit Methacrylatfunktionen modifizierten Alkoholen ist die Tatsache, dass das Edukt Glycidylmethacrylat kommerziell erhältlich ist und somit immer die gleiche Qualität aufweist, wodurch eine gezielte Modifikation von HES zu einem vernetzbaren Polymer möglich ist.

4.2.2 Charakterisierung von HESMA

Die Charakterisierung der HESMA Derivate erfolgte über die Bestimmung des Substitutionsgrades und der Molekulargewichtsverteilung. Die Einflüsse der unterschiedlichen Reaktionsparameter in der HESMA-Synthese wurden mit diesen beiden Charakterisierungsmethoden untersucht.

4.2.2.1 DS-Bestimmung der HESMA-Derivate

In der NMR-Spektroskopie lassen sich zwei Signale eindeutig dem Substituenten zuordnen; die restlichen Signale werden von den Signalen des Polymerrückgrats überlagert (Abb. 63)

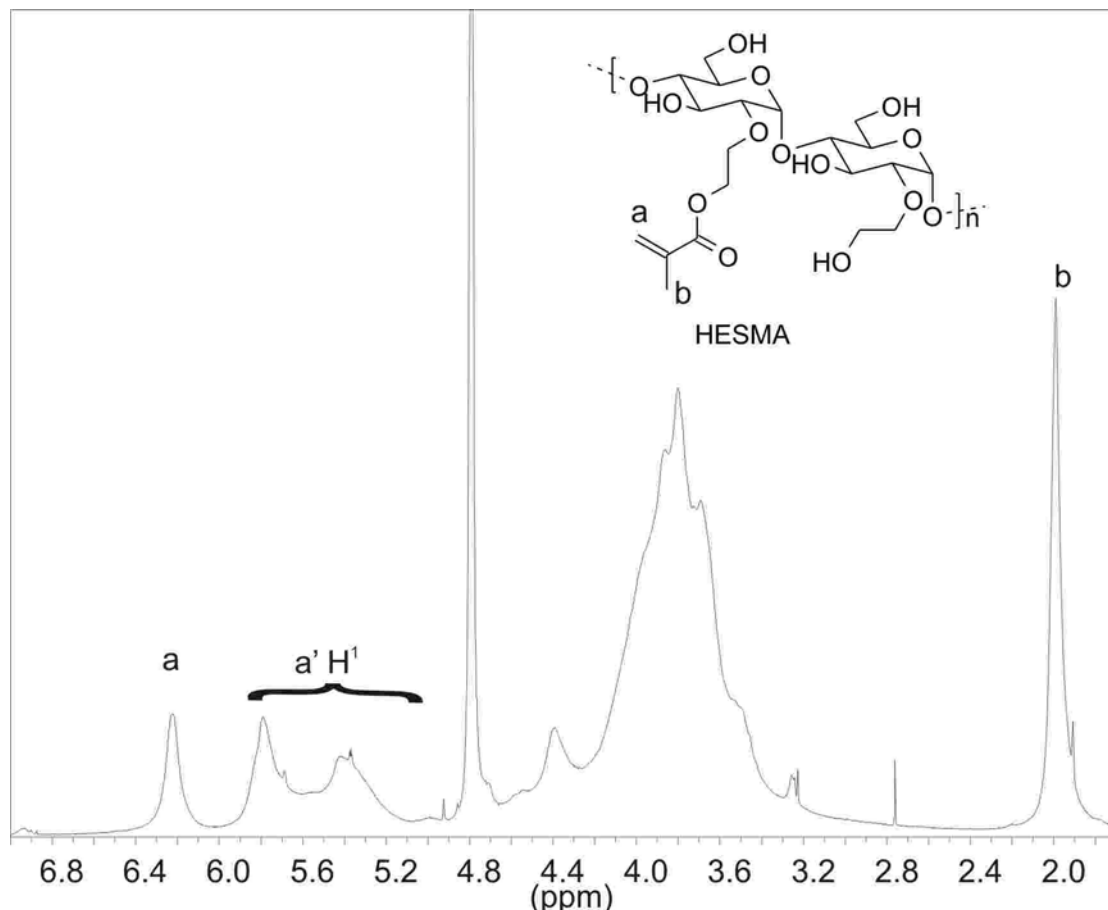


Abb. 63: ^1H -NMR-Spektrum von HESMA in D_2O (300 MHz)

Das Singulett (a) bei 6,2 ppm entspricht einem Proton der Vinylgruppe des Substituenten. Das Singulett (b) bei 2,0 ppm resultiert aus dem Resonanzsignal der Methylgruppe. Im Bereich zwischen 6,0 und 5,0 ppm überlagern sich die Signale des zweiten Protons (a') der Vinylgruppe des Substituenten und mit dem Proton der Glucosewiederholungseinheit in der C1-position. Das Multipllett bei 4,8 ppm ergibt sich aus dem Lösungsmittel Deuteriumoxid. Das daran anschließende Multipllett zwischen 4,7 und 2,5 ppm lässt sich den Protonen der Wiederholungseinheit der HES und den vier Ethylenprotonen des Hydroxyethylsubstituenten der HES zuordnen.

Der DS lässt sich, analog zur DS-Bestimmung der HESHEMA, durch die Division des Integrals des Signals des einen Vinylprotons bei 6.2 ppm (a) durch die Summe der Integrale des unsubstituierten und substituierten anomeren Protons (H^1) bestimmen:

$$DS = \frac{I_a}{\sum I_{H^1}} \quad (43)$$

Der Fehler des so berechneten Substitutionsgrades wird durch die prozentuale Abweichung des Integrals des Signals der Methylgruppe bei 2.0 ppm (b) von dem Wert drei wiedergegeben, da das Verhältnis Vinylproton (a) zu Methylprotonen im Idealfall 1:3 ist.

4.2.2.2 Einflussgrößen auf HESMA: Verhältnis der Edukte

Basierend auf den Kenntnissen aus den Synthesen der HESHEMA-Derivate wurden mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Hydroxyethylstärke zu Glycidylmethacrylat (HES:GMA) Verhältnissen untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die verwendete Hydroxyethylstärke untersucht. Dazu wurde Hydroxyethylstärke mit Dimethylaminopyridin in DMSO vorgelegt und über fünf Tage unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt. Aus dieser Lösung wurden zeitversetzt Proben entnommen, die zum einen direkt, zum anderen nach Neutralisieren mit 2M Salzsäure in unterschiedlichen Dialysemembranen („molecular weight cut off“, MWCO = 12000, bzw. 3500 g/mol) dialysiert wurden. Nach 3,5 Tagen Dialyse wurden die Produkte mittels Gefriertrocknung als weißes Pulver erhalten. Diese Proben wurden in der Gelpermeationschromatographie analysiert und das gemessene mittlere Gewichtsmittel (\overline{M}_w) gegen die Reaktionsdauer aufgetragen (Abb. 64).

Mit unterschiedlichen Aufarbeitungsverfahren werden gleiche mittlere Gewichtsmittels- (\overline{M}_w)-Werte innerhalb des üblichen Fehlers von ca. 10 Prozent erhalten. Folglich ist keine Einfluss der Aufarbeitungsmethode zu beobachten und daher kann bei der Aufarbeitung der weiteren Proben auf die Neutralisation verzichtet und die preisgünstigere Dialysiermembran MWCO 12000g/mol verwendet werden.

Die unterschiedlichen Reaktionsansätze zur Herstellung von HESMA (Abb. 61) variierten von Verhältnissen HES:GMA 2:1 über 1:1 bis zu 1:3. Die Ansätze mit hohem GMA-Anteil (HES:GMA 1:3) sind braunweiße, gummiartige Feststoffe, die in Wasser ausfallen, allerdings in Tetrahydrofuran löslich sind. Gelöst in Tetrahydrofuran lassen sich diese Polymere in Isopropanol zu weißen Flocken ausfällen. Eine Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung mittels Gelpermeationschromatographie konnte nicht erfolgen, da die Proben in Tetrahydrofuran isorefraktiv sind und somit kein Signal im Lichtstreuendetektor und Brechungsindexdetektor aufweisen. Da diese Proben durch ihre Wasserunlöslichkeit für die

Anwendung als Hydrogel in wässrigem Medium nicht nutzbar sind, wurde deren Charakterisierung nicht weiter verfolgt.

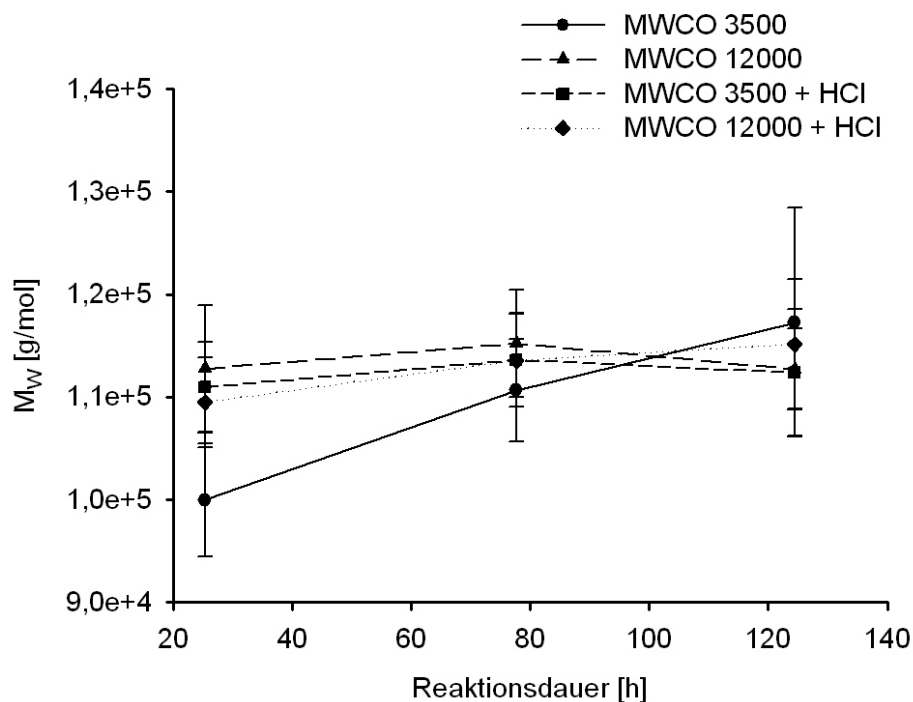


Abb. 64: Einfluss der Variation der Aufarbeitungsbedingungen hinsichtlich MWCO und Neutralisieren mit 2M HCl auf das mittlere Gewichtsmittel M_w über die Reaktionsdauer

Die Proben mit dem HES:GMA Verhältnis 2:1 und 1:1 sind wasserlöslich und somit für den Einsatz als Hydrogele geeignet. Der Verlauf der Substitutionsgrade dieser Proben mit der Zeit ergibt sich aus der Abb. 65. In dieser sind zwei HES:GMA 2:1 Ansätze mit den Symbolen (\blacktriangle , \bullet) wiedergegeben, um die Reproduzierbarkeit der Reaktion zu verdeutlichen. Des Weiteren sind auch die DS-Werte für einen Ansatz wiedergegeben, dessen HES:GMA Verhältnis 1:1 (\blacksquare) beträgt.

Die Zunahme des Substitutionsgrads der beiden Reaktionsansätze mit dem HES:GMA Verhältnis 2:1 ist bis 50 h identisch, bzw. liegt im Rahmen des Fehlers, was eine gute Reproduzierbarkeit der Reaktion belegt. Der DS dieser Proben nimmt von 24 h bis 72 h stetig zu, danach erfolgt die Steigerung des DS etwas langsamer, bis nach 146 h ein Endwert von 0,14 erreicht wird. Auch der Verlauf der Gewichtsmittel der zwei Reaktionsansätze weist für beide ähnliche Werte auf.

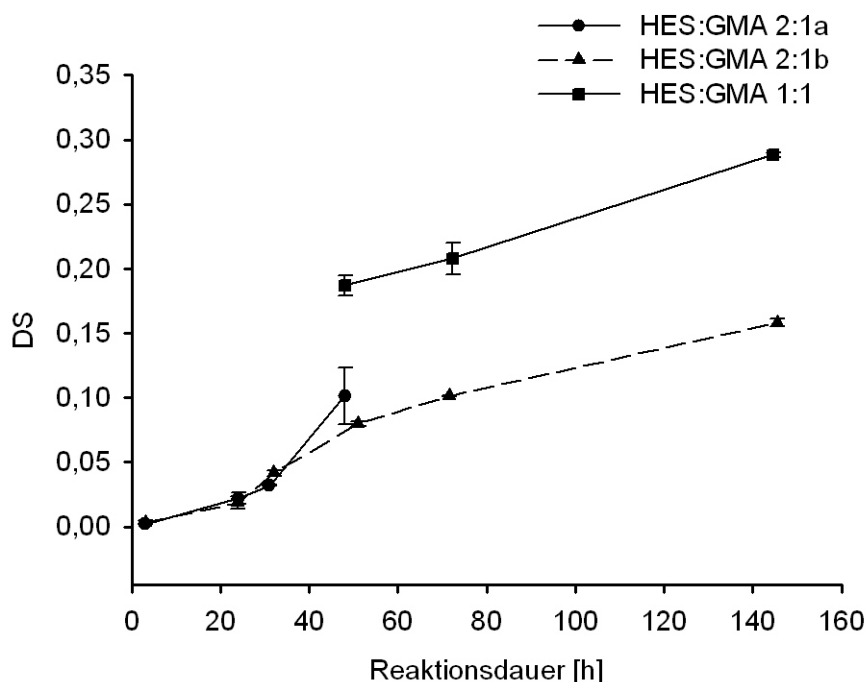


Abb. 65: Änderung des Substitutionsgrades über die Reaktionsdauer bei Variation des HES:GMA-Verhältnisses (●2:1a; ▲ 2:1b, ■ 1:1)

In Abb. 66 sind die Gewichtsmittelwerte M_w [g/mol] der beiden Reaktionsansätze mit einem HES:GMA Verhältnis von 2:1 (■, ▲) gegen die Reaktionsdauer [h] aufgetragen. Als Vergleich sind neben den beiden HESMA-Proben auch die M_w -Werte der HES-Probe (●) aufgeführt, die unter gleichen Bedingungen wie die HESMA-Proben behandelt wurde. Das Gewichtsmittel der Proben nimmt mit der Zeit zu und liegt über dem der als Vergleich eingesetzten HES-Probe. Die Verläufe der Gewichtsmittelwerte der beiden Reaktionsansätze mit einem HES:GMA Verhältnis von 2:1 sind nahezu identisch. Die M_w -Werte steigen stetig von 98000 g/mol zu Beginn bis zu 132000 g/mol mit Fehlern im Bereich von 10 Prozent nach 71,5 h an. Nach 146 h beträgt das Gewichtsmittel der HESMA-Probe sogar 190000g/mol, allerdings beträgt der mittlere Fehler 26 Prozent. Der Fehler in der Molekulargewichtsbestimmung via GPC nimmt mit zunehmender Reaktionsdauer zu. Dies geht einher mit der Abnahme des Brechungsindexinkrements (dn/dc).

Der Reaktionsansatz mit dem HES:GMA Verhältnis 1:1 erreicht bereits nach 48h einen DS von 0,19 (Abb. 65). In der darauf folgenden Reaktionszeit nimmt der DS mit ähnlicher Steigung wie beim HES:GMA Verhältnis 2:1 zu und erreicht nach 145 h seinen Endwert von 0,28. Diese Proben zeigen in der Gelpermeationschromatographie allerdings nur ein geringes Signal im Brechungsindexdetektor und kein Signal im Lichtstreuendetektor, so dass die Bestimmung des Gewichtsmittels auf Grund des großen Fehlers nicht möglich ist.

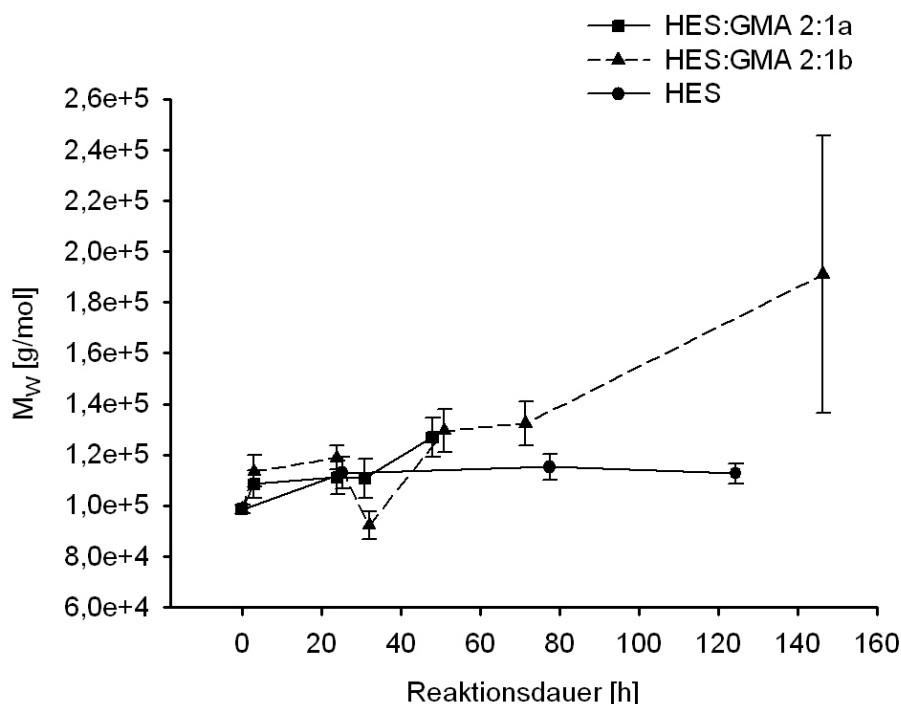


Abb. 66: Vergleich der Verläufe der Gewichtsmittel (M_w [g/mol]) der HES:GMA 2:1 Proben (■,▲) und der HES Proben (●) mit zunehmender Reaktionsdauer

Vergleiche mit den Elutionszeiten von Pullulanstandards zeigen allerdings, dass diese Proben bei Elutionszeiten eluiert werden, die Gewichtsmitteln von 1000 g/mol entsprechen. Da bei diesen Gelpermeationschromatogrammen die Wiederfindungsrate sehr gering ist, ist zum einen eine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial denkbar. Zum anderen könnte der sehr geringe Brechungsindex der Proben in dem Laufmittel Wasser mit 0,02 % Natriumazid die zu geringe Detektion erklären, da dies auch bei den Probenreihen mit dem HES:GMA Verhältnis von 2:1 zu beobachten ist. Eine Analyse mittels Solvent Enhanced Light Scattering (SELS), bei der die Probe in einem Lösemittel gelöst wird und auf eine GPC-Säule gegeben wird, die als mobile Phase ein zweites anderes Lösungsmittel besitzt, in dem die Probe einen größeren Brechungsindex aufweist, ist denkbar, wurde allerdings aufgrund der nicht vorhandenen Erfahrung mit dieser Messpraxis nicht durchgeführt. Eine Molekulargewichtsbestimmung dieser HESMA-Proben, die nicht auf Brechungsindexänderungen wie die Detektion mittels Lichtstreuungsdetektor und Brechungsindexdetektor beruht wie z.B. Osmometrie oder Viskosimetrie, wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt. Um die Entwicklung des Molekulargewichts von HESMA-Polymeren mit höheren Substitutionsgraden zu verfolgen, sollten daher in Zukunft andere Formen der Molekulargewichtsbestimmung als SEC-MALS angewendet werden.

Als Fazit zum Kapitel Synthese von HESMA lassen sich mehrere Punkte festhalten:

- Die Reaktion erfolgt schnell und reproduzierbar.
- Durch Erhöhung der Glycidylmethacrylatkonzentration nimmt die Substitution zu.
- Mit zunehmendem Substitutionsgrad nimmt die Wasserlöslichkeit ab.
- Mit zunehmendem Substitutionsgrad nimmt das Brechungsindexinkrement dn/dc in Wasser mit 0,01 wt.% Natriumazid ab, wodurch eine GPC-Messung mit Lichtstreuendetektor nicht möglich ist.
- Die nur in Tetrahydrofuran löslichen HESMA-Derivate lassen sich in Isopropanol ausfällen, aber lassen sich nicht in der THF-GPC messen, da auch in THF das Brechungsindexinkrement zu klein ist.

4.2.2.3 Abbaubarkeit von HESMA

Um HESMA als Matrixmaterial für DDS einsetzen zu können, muss dieses biokompatibel und biodegradabel sein. Da dexMA nicht hydrolytisch aber enzymatisch abbaubar ist^{17, 99}, stellt sich die Frage, ob dies für HESMA auch gilt. Daher wurde in ersten Untersuchungen das enzymatische Abbauverhalten untersucht. Die hydrolytische Abbaubarkeit wurde an den Hydrogelen aus HESMA untersucht. Dazu wurde HESMA, wie auch schon HESHEMA, mit 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (EC 3.2.1) umgesetzt. Dieses Enzym ist eine Hydrolase, die in Stärke (Amylose, Amylopektin) und Glycogen die α -1,4-Verknüpfung im Inneren der Kette statistisch spaltet. Von diesem Endoenzym wird die α -1,6-Bindung dabei nicht zerlegt und bleibt erhalten. Für diese Untersuchungen wurde eine HESMA-Probe verwendet, die einen DS von 0,122, ein M_w von 127000 g/mol und eine Reaktionsdauer von 48 h aufweist. Aus diesem Experiment werden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und die entsprechende Menge α -Amylase-Lösung wieder zugegeben. Die α -Amylase wird durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff denaturiert. Diese Lösungen werden gefriergetrocknet und mittels GPC gemessen.

In Abb. 67 ist als Vergleich das Elutionschromatogramm der Probe vor der Enzymzugabe aufgetragen (HESMA). Die entstehenden Signale der HESMA-Abbauprodukte sind zu deutlich höheren Elutionszeiten verschoben. Die Lichtstreusignale bei 14 mL resultieren aus noch nicht vollständig gelösten Polymeragglomeraten, die im konzentrationsabhängigen Brechungsindexdetektor kein Signal liefern. Ihre Konzentration ist somit sehr gering und soll

daher nicht weiter betrachtet werden. Die Proben bilden allerdings in beiden Detektoren drei Peaks, wie es auch bei den HESHEMA-Proben der Fall ist.

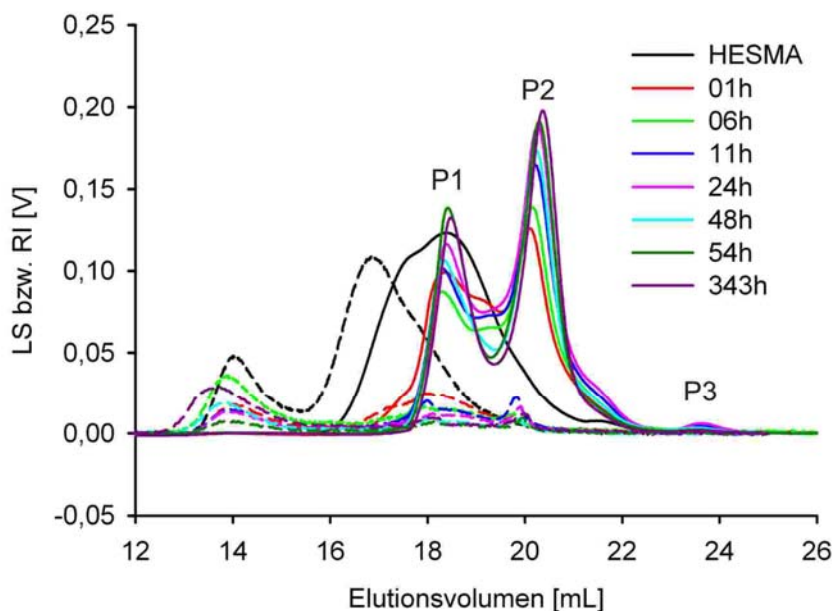


Abb. 67: GPC-Elutionsprofile von HESMA nach enzymatischem Abbau durch α -Amylase (.... = Lichtstredetektor-(LS)-Signal; - = Brechungsindexdetektor-(RI)-Signal)

Der erste Peak (P1) hat sein Maximum bei 18 ml, der zweite (P2) bei 20 mL. Die ersten beiden Peaks gehen dabei ineinander über. Der zweite Peak weist im RI-Detektorsignal ein deutlich stärkeres Signal auf als der erste Peak und zeigt eine Schulter im niedermolekularen Bereich, die mit zunehmender Reaktionsdauer abnimmt. Bei kleinen Abbauzeiten des HESMAs mit der α -Amylase besteht eine Schulter zwischen den beiden Peaks. Mit zunehmender Reaktionsdauer wird, wie bei der HESHEMA, der Übergang zwischen dem ersten und dem zweiten Peak schärfer, die Schulter verschwindet. Ein dritter Peak mit einer sehr kleinen Signalthöhe im Brechungsindexdetektor tritt, wie auch bei der HESHEMA und der HES, bei einem Elutionsvolumen von 23 mL auf. Dieser kleine Peak bei sehr hohen Elutionsvolumina resultiert aus kleinen Fragmenten wie Monomeren oder Oligomeren, die zu klein sind, um im Lichtstredetektor ein Signal zu bewirken. Da dieser Anteil sehr gering ist, werden im Weiteren nur die ersten beiden Peaks näher betrachtet.

Die Signalthöhen dieser Peaks im Lichtstredetektor sind sehr gering. Die Auswertung über die Lichtstredetektorsoftware ergibt dabei Messergebnisse mit großen Messungenauigkeiten. Daher wurde eine Kalibrierung der Säulen mit engverteilten Pullulanstandards durchgeführt und die Molekulargewichte der Polymere somit relativ zu Pullulan bestimmt.

Hydroxyethylstärkestandards, die als Vergleich besser geeignet gewesen wären, waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht zugänglich. Die relativ zu Pullulan bestimmten mittleren Gewichtsmittel \overline{M}_w der Peaks P1 (bei 18 mL) und P2 (bei 20 mL) lassen sich gegen die Abbaudauer auftragen (Abb. 68).

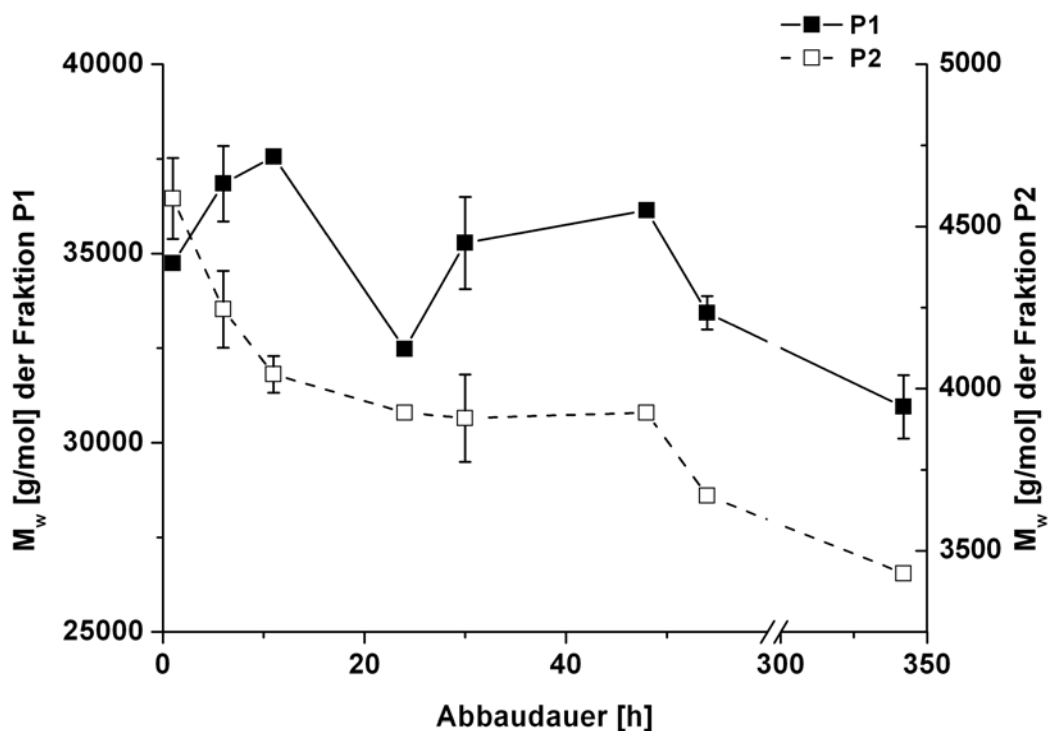


Abb. 68: Änderung der relativ zu Pullulan bestimmten \overline{M}_w -Werte der beiden Peaks (P1 =18 mL (●); P2=20 mL (○)) der enzymatischen Abbauprodukte aus HESMA mit zunehmender Abbaudauer

Analog zu den Abbauntersuchungen an HESHEMA (Abb. 34) sind in dieser Abbildung auf den Ordinaten die mittleren Gewichtsmittel \overline{M}_w aus dem ersten Peak (P1) und dem zweiten Peak (P2) in g/mol aufgetragen. Die Dauer des enzymatischen Abbaus mit α -Amylase ist auf der Abszisse wiedergegeben.

Der erste Peak P1 der HESMA steigt nach 11 h von 35000 g/mol auf 37000 g/mol an und sinkt daraufhin nach 342 h auf 30000 g/mol ab. Die \overline{M}_w -Werte für den P2 der HESMA nehmen nach 342 h von 4600 g/mol auf 3400 g/mol ab.

Im Vergleich mit den Werten der HES und der HESHEMA zeigen sich nach 342 h für die HESMA gleich große \overline{M}_w -Werte (Abb. 69).

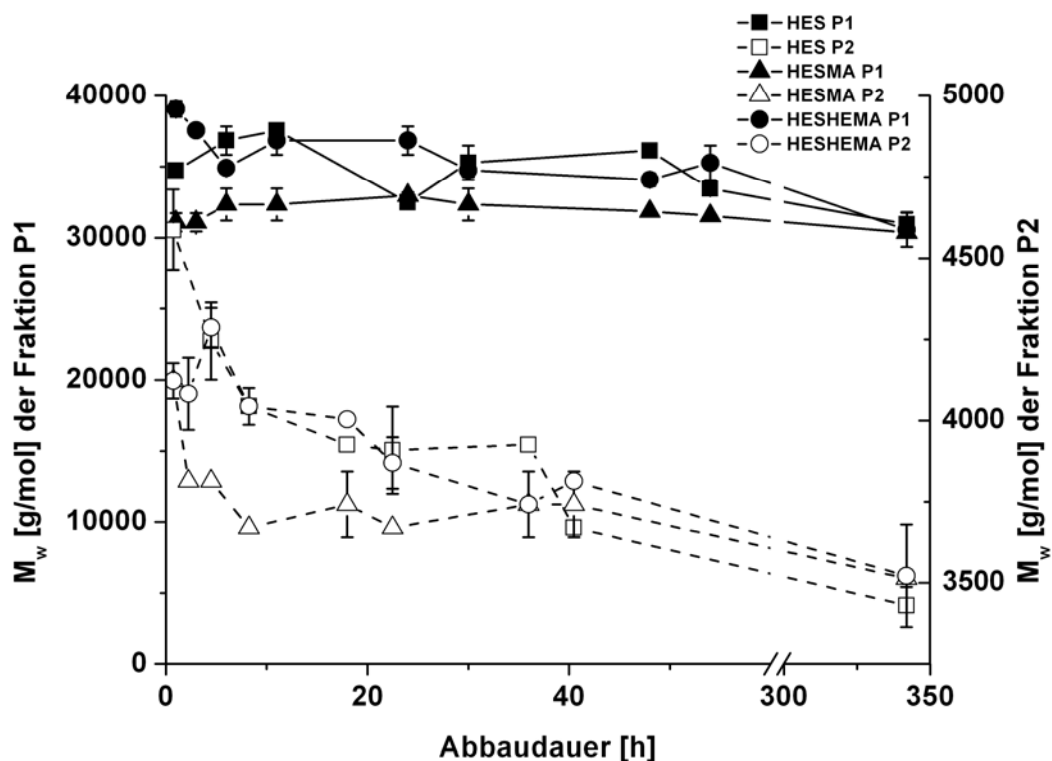


Abb. 69: Änderung der zu Pullulan relativen \overline{M}_w -Werte der Fraktionen P1 und P2 der Abbauprodukte von HES (■), HESMA (▲) und HESHEMA (●) mit zunehmender Abbaudauer

Durch die schon beschriebene blockartige Verteilung der Hydroxyethylsubstituenten in der HES ergibt sich auch für HESMA solch ein Abbau in drei Fragmente mit einem Block im Bereich von 30000 g/mol, einem Block im Bereich von 3400 g/mol und kleine Oligomer- bzw. Monomerbestandteile mit ca. 170 g/mol. Die beobachtete Schulter zwischen den beiden Hauptpeaks bei geringer Abbaudauer zeigt, dass die Substitution durch die Methacrylatgruppe den enzymatischen Abbau verzögert und zu etwas größeren Molekulargewichten führt. Bei entsprechend langer Abbaudauer werden wie bei der HESHEMA Fraktionen erhalten, die ein ähnliches hydrodynamisches Volumen aufweisen wie die Abbauprodukte der HES. HESMA zeigt somit in diesem ersten Test zur enzymatischen Abbaubarkeit eine Verzögerung des Abbaus, aber nach entsprechender Abbaudauer ähnlich große Polymerbruchstücke wie die als Basis eingesetzte HES.

4.2.3 Hydrogele aus HESMA

Aus den HESMA-Polymeren lassen sich in den schon für die Gele aus HESHEMA und HESPEGMA verwendeten Verhältnissen, 10 wt.% in 0,01 wt.% Igarcure 2959 in Wasser, Hydrogele herstellen. Zudem lassen sich durch die gute Wasserlöslichkeit der Proben auch 20 wt.% Lösungen von HESMA in 0,01 wt.% Igarcure 2959 in Wasser herstellen. Die Gele sind dabei farblos und nicht opak wie die HESHEMA-Hydrogele, was auf die bessere Wasserlöslichkeit zurückzuführen ist. Die HESMA-Hydrogele ähneln somit mehr den HESPEGMA-Hydrogelen, die auch farblos bzw. leicht opak sind, als den HESHEMA-Hydrogelen. Von einem der Hydrogele (10 wt.% in 0,01 wt.% Igarcure 2959 in Wasser) wurden Kryo-REM-Aufnahmen angefertigt (Abb. 70).

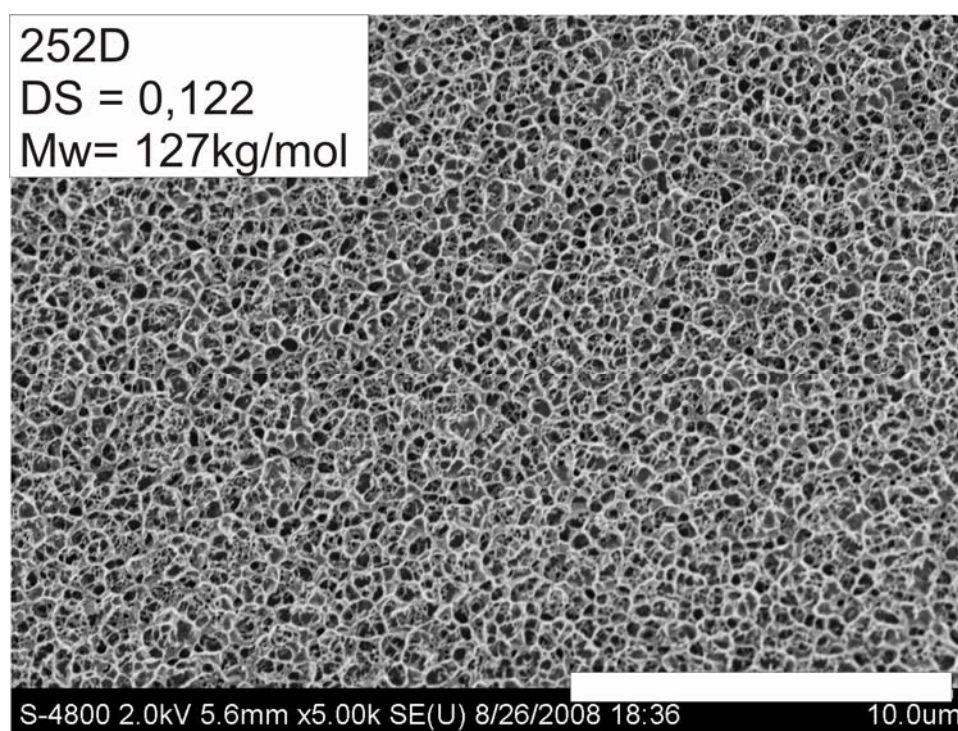


Abb. 70: Kryo-REM Aufnahme eines HESMA-Hydrogels (10 wt.% in 0,01 wt.% Igarcure 2959 in Wasser)

Die Kryo-REM-Aufnahmen belegen, dass es bei der Hydrogelbildung zur Ausbildung von Kanälen und Poren im Bereich von 0,5 μm und kleiner kommt. Diese Kanalbildung lässt sich mit der Phasenseparation während des Vernetzungsschrittes erklären. Zur quantitativen Betrachtung der HESMA-Hydrogele werden diese mittels Quellungsmessungen und Rheologiemessungen untersucht.

4.2.3.1 Quellung

Sowohl für die Quellungs- als auch für die Rheologiemessungen müssen die HESMA-Polymere zu Hydrogelen umgesetzt werden. Dabei zeigt sich, dass sich nicht alle HESMA-Polymere zu Hydrogelen umsetzen lassen. Der Test zur Gelbildung besteht darin, ob die 10 wt.% HESMA-Lösung in 0,01 wt.% Igarcure 2959 in Wasser nach 30 Minuten UV-Bestrahlung (3-5 mW/cm²) den „vial inversion test“ besteht. Die HESMA-Polymere und ihre charakteristischen Messgrößen sind in Tab. 3 wiedergegeben.

Tab. 3: HESMA-Polymere und ihre Gelbildung

HES:GMA	Reaktionsdauer	DS NMR	Fehler DS	Mw [g/mol]	Fehler Mw [g/mol]	Gelbildung
2:1 a	3 h	0,0023	0,0002	108500	5400	Nein
2:1 a	24 h	0,0219	0,0045	111000	6600	Nein
2:1 a	31 h	0,0319	0,0003	110700	7700	ja
2:1 a	48 h	0,1014	0,0220	126850	7600	ja
2:1 b	3 h	0,0033	0,0016	113500	6200	Nein
2:1 b	24 h	0,0187	0,0050	118800	4700	Nein
2:1 b	32 h	0,0416	0,0024	92200	5500	Ja
2:1 b	51 h	0,0799	0,0019	129400	8400	Ja
2:1 b	72 h	0,1013	0,0007	132400	8600	Ja
2:1 b	146 h	0,1582	0,0032	191000	54400	Ja
1:1	48 h	0,1869	0,0081	nein	nein	Ja
1:1	72 h	0,2079	0,0125	nein	nein	Ja
1:1	145 h	0,2882	0,0019	nein	nein	Ja

Bei den beiden Ansätzen mit einem HES:GMA Verhältnis von 2:1 (a, b) zeigt sich, dass Hydrogele erst mit einem DS ab 0,03 gebildet werden.

Die Hydrogele aus den HESMA-Polymeren zeigen wie HESHEMA die Ausbildung eines Gleichgewichtsquellungs Zustands. Allerdings zeigt die Probe HES:GMA 2:1 a mit einem DS von 0,03 ein abweichendes Quellungsverhalten, das dem der HESPEGMA-Hydrogele ähnelt. Nach intensiver Wasseraufnahme kommt es zum Abbau des Hydrogels kommt (Abb. 71).

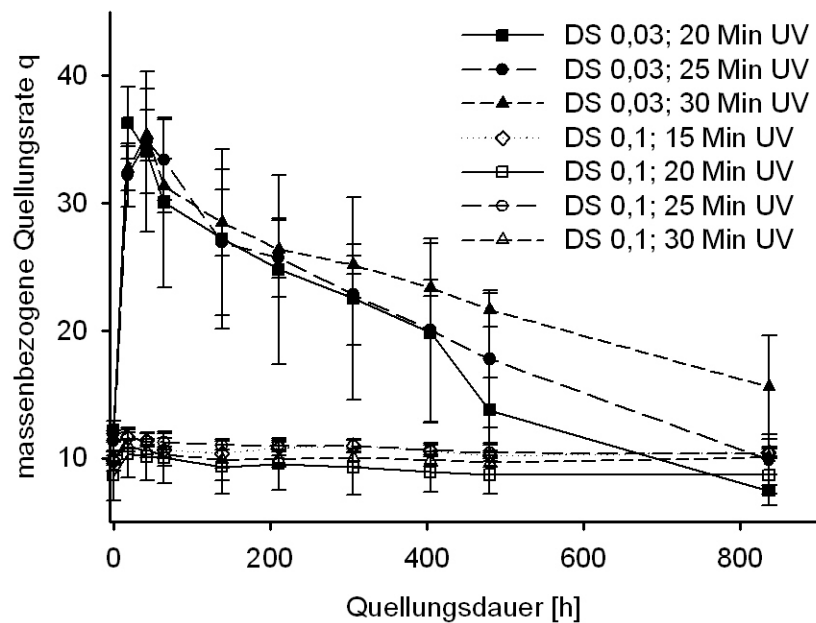


Abb. 71: Änderung der massenbezogenen Quellungsrate q zweier HESMA-Hydrogele 2:1 a mit einem DS von 0,03 und 0,1 nach unterschiedlichen UV-Belichtungszeiten mit zunehmender Quellungsdauer

Die Hydrogele aus der HESMA-Probe mit dem HES:GMA Verhältnis von 2:1 a zeigen, unabhängig von der UV-Belichtungsdauer, eine Zunahme des Gewichts in Folge der Wasseraufnahme um das bis zu 35-fache ihrer Trockenmasse. Über die Quellungsdauer von 850 h sinkt die massenbezogene Quellungsrate q auf Werte von 10 bis 20, was auf einen Abbau der Hydrogelmatrix in Folge der Hydrolyse hindeutet. Mit zunehmender Quellungsdauer zeigt sich, dass die Hydrogele, die länger der UV-Bestrahlung ausgesetzt wurden, größere massenbezogene Quellungsraten q aufweisen, bzw. in geringerem Maße abgebaut sind. Durch die längere UV-Bestrahlung kommt es bei diesem Polymer zur Ausbildung von mehr Vernetzungspunkten, deren größere Anzahl den Abbau verlangsamt. Zur weiteren Auswertung werden, wie bei den HESPEGMA-Hydrogelen, die maximalen Quellungsraten genutzt. Die HESMA-Hydrogele, die aus dem HESMA-Polymer 2:1 a DS 0,1 hergestellt wurden, zeigen auch eine Abnahme der Quellungsrate q über die Quellungsdauer, deren geringe Abnahme allerdings innerhalb der Standardabweichung der Messmethode liegt. Bei diesem Polymer ist keine Abhängigkeit der Hydrogeleigenschaften von der Bestrahlungsdauer zu erkennen. Die Netzwerkeigenschaften ändern sich nach 15 Minuten UV-Bestrahlung nicht mehr, die Netzwerkbildung ist somit wie bei den HESHEMA-Hydrogelen schon nach 15 Minuten abgeschlossen. Die HESMA-Polymere zeigen eine gute Wasserlöslichkeit, so dass sich auch 20 wt.%ige HESMA-Lösungen in 0,01 wt.% Igarcure

2959 in Wasser herstellen lassen. Die daraus gebildeten Hydrogele weisen keinen Abbau der Hydrogelzylinder auf, so dass ein Gleichgewichtsquellungs Zustand erreicht wurde. Aus diesen Quellungsdaten resultieren somit folgende \overline{M}_c -Werte für die Hydrogele aus den unterschiedlichen HESMA-Polymeren mit unterschiedlichen Bestrahlungsdauern (Abb. 72).

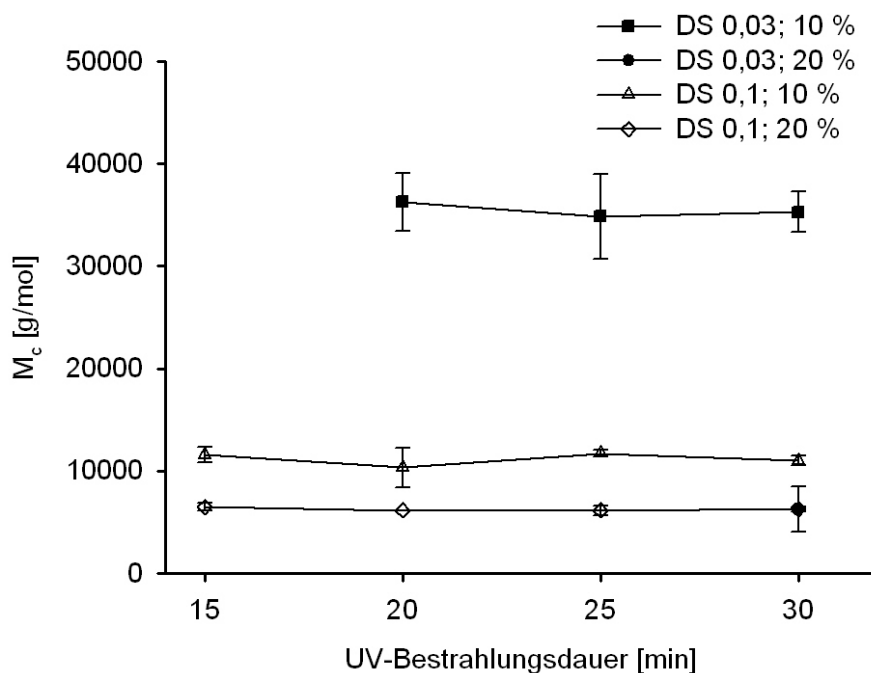


Abb. 72: Änderung der \overline{M}_c -Werte zweier HESMA-Hydrogele 2:1 a mit einem DS von 0,03 und 0,1 und unterschiedlichen Polymerkonzentrationen mit zunehmender UV-Bestrahlungsdauer

Die Hydrogele, die aus 10 wt.% HESMA-Lösungen in 0,01 wt.% Irgacure 2959 in Wasser hergestellt wurden, zeigen einen deutlichen Unterschied in den \overline{M}_c -Werten. Die Proben mit einem DS von 0,03 weisen ein \overline{M}_c von ca. 35000 g/mol bei allen Belichtungsdauern auf. Da hierbei die Maximalwerte der Quellungsmessungen verwendet wurden, ergibt sich nicht die Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer, die sich bei längeren Quellungsmesszeiten einstellen. Die Proben mit einem DS von 0,1 weisen hingegen \overline{M}_c -Werte im Bereich von ca. 11000 g/mol auf. Auch hier ist kein Unterschied der Geleigenschaften mit Variation der UV-Bestrahlungsdauer zu verzeichnen. Der Unterschied von ca. 24000 g/mol lässt sich durch die unterschiedlichen Substitutionsgrade der HESMA-Polymere erklären; je höher der DS, umso geringer ist das \overline{M}_c .

Bei den Hydrogelen, die aus 20 wt.% HESMA-Lösungen in 0,01 wt.% Igarcure 2959 in Wasser hergestellt wurden, zeigt sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen HESMA-Polymeren, da die \overline{M}_c -Werte mit ca. 6000 g/mol nahezu identisch sind. Durch die höhere Konzentration treffen in beiden Polymerlösungen die Methacrylatgruppen leichter aufeinander und bilden somit ein Netzwerk aus, dessen Eigenschaft durch mehr oder weniger Methacrylatgruppen nicht weiter beeinflusst wird. Somit wären auch Hydrogele zugänglich, die aus 20 wt.%igen Lösungen von HESMA-Polymeren mit geringerem DS hergestellt werden. Diese Untersuchungen sind nicht vertieft worden, bieten aber ein mögliches Potenzial der HESMA-Polymere in Hinblick auf die zunehmende hydrolytische Abbaubarkeit mit Abnahme des DS, wie es bei den Hydrogelen aus 10 wt.%igen HESMA-Lösungen zutrifft.

Neben der Variation der Polymerkonzentration lassen sich die Hydrogeleigenschaften durch eine weitere Einstellgröße beeinflussen, die bisher konstant gehalten wurde, die Initiatorkonzentration. In den bisher vorgestellten Untersuchungen wurden Polymerlösungen in 0,01 wt.% Igarcure 2959 in Wasser hergestellt. Das Herabsetzen der Initiatorkonzentration auf 0,001 wt.% Igarcure 2959 in Wasser führt zu der erwarteten Vergrößerung der \overline{M}_c -Werte, was für größere Maschenweiten spricht (Abb. 73).

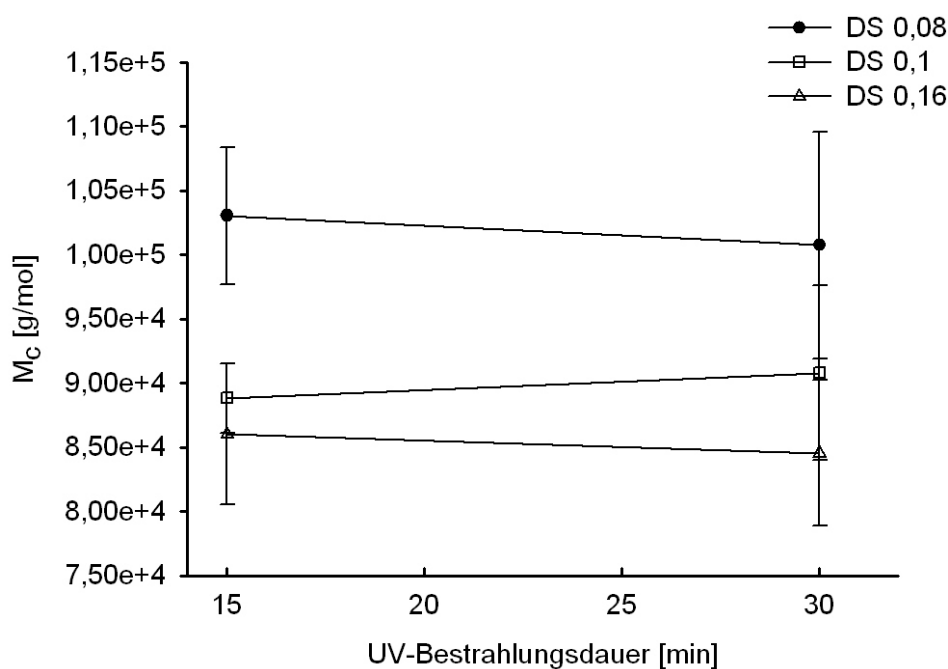


Abb. 73: Änderung der \overline{M}_c -Werte der HESMA-Hydrogele 2:1 b mit einem DS von 0,08 (●), 0,10 (□) und 0,16 (Δ) 10 wt.% in 0,001 wt.% Igarcure 2959 in Wasser mit zunehmender UV-Bestrahlungsdauer

10 wt.%ige Lösungen von HESMA-Polymeren mit einem geringeren DS als 0,08 lassen sich bei dieser geringeren Initiatorkonzentration nicht zu Hydrogelen umsetzen. Es gilt auch bei dieser Initiatorkonzentration, je höher der DS, umso geringer sind die $\overline{M_c}$ -Werte. Die Hydrogele aus den HESMA-Polymeren zeigen auch bei dieser Initiatorkonzentration keine Unterschiede bei einer UV-Bestrahlungsdauer zwischen 15 und 30 Minuten. Die Vernetzungsreaktionen scheinen schon nach 15 Minuten beendet zu sein. MRX-Messungen mit geringeren UV-Belichtungszeiten, wie sie für die HESHEMA-Hydrogele durchgeführt worden sind, könnten die optimale Bestrahlungsdauer ermitteln. Durch die geringere Konzentration an Initiator-molekülen ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass die nach UV-Bestrahlung entstandenen Initiatorradikale auf eine Methacrylatgruppe treffen, um die Vernetzung zu starten. Die Zeitabhängigkeit der Gelherstellung sollte bei geringen Initiatorkonzentrationen somit stärker hervortreten. Untersuchungen über Magnetrelaxometrie könnten diese Unterschiede besser deutlich machen, wurden allerdings mit diesem Polymer noch nicht durchgeführt, da keine Messzeit zur Verfügung stand. Die $\overline{M_c}$ -Werte der HESMA-Probe mit einem DS von 0,1 liegen im Bereich von 90000 g/mol und sind somit rund 800 %

mal so groß als die $\overline{M_c}$ -Werte aus der Probenreihe mit der um den Faktor 10 konzentrierteren Initiatorlösung. Die Variation der Initiatorkonzentration ist somit eine sehr wirkungsvolle Stellschraube, um die Geleigenschaften zu modifizieren.

4.2.3.2 Rheologie

Da die Rheologie eine geringere Messungenauigkeit aufweist als die Quellungsmessungen, wurde der Frage nachgegangen, ob das Herabsetzen der Initiatorkonzentration auch die Unterschiede durch die unterschiedliche Belichtungsdauer stärker zum Vorschein bringt. Dazu wurden aus 10 wt.%igen HESMA-Lösungen in 0,001 wt.% Igarcure 2959 in Wasser Hydrogelscheiben hergestellt und mittels Rheologie gemessen. Aus Zeitgründen wurden nur zwei unterschiedliche HESMA-Polymere untersucht (Tab. 4). Die $\overline{M_c}$ -Daten aus den rheologischen Untersuchungen zeigen keinen signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse der Quellungsmessungen, dass die maximal mögliche Vernetzung schon nach 15 Minuten erreicht wird, werden bestätigt. Daher müssen Probenreihen mit unterschiedlichen

Belichtungszeiten wie mit den HESHEMA-Hydrogelen (s. Kap. 3.3.3) erfolgen, um diese Einflussgröße auf die Geleigenschaften näher zu untersuchen.

Tab. 4: \overline{M}_c -Werte aus Rheologie von HESMA-Hydrogelen, 10 wt.% in 0,001 wt.% Irgacure 2959

Batch	DS	Mw [g/mol]	UV [min]	Mc [g/mol]	Abweichung Mc [g/mol]
HES:GMA 2:1 a	0,104	126000	30	61700	660
HES:GMA 2:1 b	0,08	130000	15	62000	110
HES:GMA 2:1 b	0,08	130000	30	61000	600

Diese Unterschiede der HESMA-Hydrogele sind sehr gering, und sollten daher in Zukunft mit der deutlich sensitiveren Messmethode Magnetrelaxometrie bestimmt werden. Die Daten der \overline{M}_c -Werte stimmen auch bei den HESMA-Proben, wie bei den anderen Polymeren, nicht mit denen der Quellungsmessung überein. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, muss der Flory-Huggins-Polymer-Lösungsmittel-Wechselwirkungsparameter χ_1 des jeweiligen Polymers bestimmt werden, was aus Zeitgründen nicht erfolgt ist.

4.2.3.3 Abbaubarkeit von HESMA-Hydrogelen

Zu Untersuchung der Abbaubarkeit von HESMA-Hydrogelen wurden erste Quellungsmessungen mit Hydrogelen in Gegenwart von Enzymen durchgeführt. Dazu wurden Gelzylinder nach dem üblichen Verfahren mit HESMA (10 wt.%, HES/GMA: 2/1, Herstellungsdauer: 48 h, \overline{M}_w : 126000 g/mol, DS: 0,10, 0,01wt% Irgacure 2959) hergestellt. Bei der Herstellung dieser Hydrogele fungierte zum einen reiner Sörensenpuffer (pH 7,4) als Lösungsmittel (Hydrogele unbeladen) und Sörensenpuffer (pH 7,4) mit 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (α -Amylase) (3,9 IU/mL) (Hydrogele beladen) als Lösungsmittel. Die Hydrogele wurden nach 30 minütiger UV-Bestrahlung in Sörensenpuffer (pH 7,4) mit 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (α -Amylase) (3,9 IU/mL) bei 37 °C im Wasserbad gelagert und mittels der Filtermethode gravimetrisch untersucht. Dabei ergibt sich folgender Verlauf der \overline{M}_c -Werte über die Abbaudauer (Abb. 74).

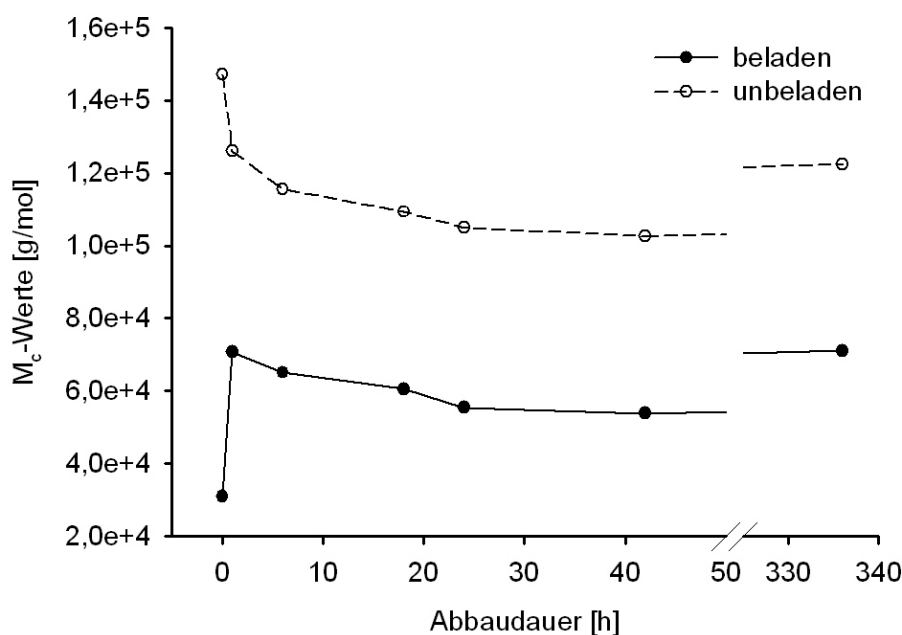


Abb. 74: \overline{M}_c -Veränderung durch Lagerung der beladenen (●) und unbeladenen (○) HESMA-Hydrogele in Sörensenpuffer mit 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (α -Amylase)

Die beiden Proben verhalten sich innerhalb der ersten 3 Stunden unterschiedlich. Die beladenen Hydrogele quellen in den ersten 3 Stunden auf, so dass sich ein erhöhter \overline{M}_c -Wert nach 3 Stunden von 72000 g/mol gegenüber dem \overline{M}_c -Wert nach 1 Stunde von 31000 g/mol einstellt. Die unbeladenen Hydrogele weisen sehr viel größere \overline{M}_c -Werte auf. So beträgt nach 1 Stunde der \overline{M}_c -Wert 150000 g/mol. Der \overline{M}_c -Wert nimmt von der ersten auf die dritte Stunde stark ab auf 125000 g/mol, was an überschüssiger Flüssigkeit auf dem Hydrogelkörper bei der ersten Messung liegen kann. Innerhalb von 42 Stunden nehmen die \overline{M}_c -Werte bei beiden Proben gleichmäßig um circa 10000 g/mol ab. Diese Abnahme liegt allerdings in dem Fehler der Messmethode. In dem Zeitraum von 42 h auf 336 h erfolgt in beiden Proben ein Abbau des Hydrogels, was in einer erhöhten Wasseraufnahme resultiert, wodurch sich größere \overline{M}_c -Werte ergeben. Die beladenen Hydrogele, bei der das Enzym auch schon vor der Hydrogelbildung zugegeben wurde, zeigt, wie auch schon bei den HESHEMA-Hydrogelen (s. Kap. 3.3.4), kleinere \overline{M}_c -Werte als die unbeladenen Hydrogele. Wie bei den HESHEMA-Hydrogelen kann die Hydrogelbildung zur Schädigung des Enzyms geführt haben. Wenn dies im Hydrogel verbleibt, ist der Konzentrationsgradient der Enzyme geringer als bei der beladenen Vergleichsprobe. Die Diffusion und dadurch der Abbau der Hydrogelmatrix

erfolgen langsamer. Der Einbau des Enzyms in das Hydrogel als Teil des Netzwerks ist auch möglich, wodurch die Maschenweite verringert werden kann. Es lässt sich allerdings festhalten, dass die HESMA-Hydrogele durch 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (α -Amylase) zwar abgebaut werden, aber nach 336 h noch nicht komplett gelöst sind.

4.2.4 Fazit zu HESMA

Die Reaktion von Glycidylmethacrylat mit Hydroxyethylstärke liefert HESMA-Polymere. Im Gegensatz zur Synthese von HESHEMA und HESPEGMA sind die eingesetzten Edukte in gleich bleibender Qualität zugänglich, wodurch sich die Polymere gut reproduzierbar herstellen lassen. Der Substitutionsgrad (DS) und das Molekulargewicht nehmen mit zunehmender Reaktionsdauer stetig zu. Allerdings nimmt mit zunehmendem Substitutionsgrad das Brechungsindexinkrement ab, so dass ab einem DS größer als 0,16 mit dem verwendeten SEC-MALS-System kein Signal mehr detektiert werden kann. Wie auch bei der HESHEMA zeigt sich eine Abnahme der Wasserlöslichkeit mit zunehmendem Substitutionsgrad. HESMA-Proben, die mit HES:GMA Verhältnissen von 1:2, 1:5 und 1:10 hergestellt werden, sind nicht mehr wasserlöslich. Diese bräunlichen Proben lassen sich in THF lösen und in Isopropanol ausfällen, was für das Vorhandensein von Polymeren spricht. SEC-MALS-Messungen mit THF als Laufmittel ergeben ebenfalls keine Signale in den verwendeten Detektoren, da auch hier sehr geringe Brechungsindexinkremente vorliegen und die Proben isorefraktiv zum Laufmittel sind. Die Bestimmung des Molekulargewichts von HESMA-Polymeren sollte daher in Zukunft mit anderen Messmethoden durchgeführt werden, die nicht auf Brechungsindexinkremente angewiesen sind wie z.B. Osmometrie oder Viskosimetrie. Auch eine zukünftige Analyse mittels Solvent Enhanced Light Scattering (SELS) ist denkbar, bei der das Lösungsmittel der Probe und das Laufmittel unterschiedlich sind, und sich somit größere Brechungsindexinkremente ergeben.

Die HESMA-Proben, die einen Substitutionsgrad kleiner 0,3 aufweisen, lassen sich sehr gut in Wasser lösen. Mit den wasserlöslichen Proben sind im Gegensatz zu HESHEMA auch klare 20 wt.%ige Lösungen möglich, die sich zu transparenten Hydrogelen umsetzen lassen. Die Phasenseparation ist hierbei weniger stark ausgeprägt als bei HESHEMA. Die Wasserlöslichkeit ist vergleichbar gut wie die der HESPEGMA-Derivate. Aus den HESMA-Proben lassen sich mit der bisher verwendeten 10 wt.%igen Standardkonzentration in 0,01 wt.% Photoinitiator Irgacure 2959 Hydrogele ab einem Substitutionsgrad größer als 0,03 herstellen. Zudem lassen sich auch mit Photoinitiatorlösungen mit 0,001 wt.% Irgacure 2959

Hydrogele herstellen, allerdings erst ab einem Substitutionsgrad von 0,08. Bei diesen Gelen zeigt sich der erwartete Zusammenhang zwischen Substitutionsgrad des Polymers und Geleigenschaften. Je höher der DS ist, umso geringere \overline{M}_c -Werte werden erhalten. Daneben zeigt sich, je geringer die Photoinitiatorkonzentration ist, umso größere \overline{M}_c -Werte ergeben sich. So steigt der \overline{M}_c -Wert des HESMA-Hydrogels mit einem DS von 0,1 von 11000 auf 88000 g/mol (Zunahme Faktor 800) bei Verringerung des Photoinitiatorgehalts um den Faktor 10. Diese Variationsmöglichkeit ermöglicht eine günstige und einfache Form der Modifizierung der Geleigenschaften und sollte in weiteren Untersuchungen mehr in den Fokus rücken.

Interessant ist auch der hydrolytische Abbau der HESMA-Gele mit geringem Substitutionsgrad, der sich bei dem Vergleichsmaterial dexMA nicht einstellt¹⁷. Die Unterschiede in der Wahl des Grundpolymers mit Hydroxyethylstärke gegenüber Dextran zeigen somit erfreuliche Aussichten zur Ausbildung eines DDS auf Hydroxyethylstärkebasis. Unter enzymatischen Abbaubedingungen mit α -Amylase werden aus HESMA-Polymeren bei entsprechend langer Abbaudauer Abbauprodukte gebildet, die ähnliche hydrodynamische Volumina aufweisen wie HES und HESHEMA. Dies ist ein erster Hinweis auf eine vergleichbare Biokompatibilität wie HES, allerdings müssen, wie für die übrigen HES-Derivate HESHEMA und HESPEGMA, noch mehr Tests durchgeführt werden, um deren Biokompatibilität zu untersuchen. Zudem zeigen die ersten enzymatischen Abbauntersuchungen der HESMA-Hydrogele mit α -Amylase eine ähnlich gute Abbaubarkeit wie die HESHEMA-Hydrogele.

Neben der Photoinitiatorkonzentration lässt sich bei der Herstellung von Hydrogelen auch die Polymerkonzentration variieren, um Einfluss auf die Maschenweite zu nehmen. Mit HESMA lassen sich aufgrund der guten Wasserlöslichkeit auch 20 wt. %ige Lösungen problemlos herstellen und zu Hydrogelen umsetzen. Die dabei gebildeten Hydrogele zeigen sehr geringe \overline{M}_c -Werte im Bereich von 6000 g/mol, was auf sehr geringe Maschenweiten hindeutet. Durch Quellungsmessungen lassen sich dabei keine Unterschiede zwischen den HESMA-Proben mit unterschiedlichen Substitutionsgraden feststellen. Die Konzentration scheint somit zu hoch zu sein, um eine Kontrolle über den Substitutionsgrad zu erhalten. Dennoch sollten Untersuchungen mit verschiedenen Polymerkonzentrationen erfolgen, um die Geleigenschaften auch auf diesem Wege zu beeinflussen.

Durch die gute Reproduzierbarkeit der Synthese und seine gute Wasserlöslichkeit qualifiziert sich HESMA als viel versprechender Kandidat für die DDS-Entwicklung, der die schon guten Eigenschaften von HESHEMA und HESPEGMA noch übertreffen könnte.

5. Vergleich der unterschiedlichen HES-Derivate

Ausgehend von dem schon bestehenden Material HESHEMA wurden im Rahmen dieser Arbeit Polymere hergestellt und untersucht, die eine Variation der Spacerlänge und der Anbindungsart des Spacers an das Hydroxyethylstärkerückgrat beinhalten.

Zunächst sollen die Synthese der drei Polymerderivate und ihre Eigenschaften miteinander verglichen werden.

Die Herstellung von HESHEMA wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, die eine verlässliche und reproduzierbare Synthese von größeren Polymermengen bestimmt. Die Güte des eingesetzten Edukts, dem aktivierten Methacrylat HEMACI, ist dabei der entscheidende Faktor. Bei der Aufreinigung und dem Einengen des Lösungsmittels kann es zur Autopolymerisation kommen, so dass durch die hohe Reaktivität des Substituenten dieser nicht in gleich bleibender Qualität hergestellt werden kann. Durch die Restgehalte an Edukten aus der HEMACI-Herstellung kommt es bei der Synthese von HESHEMA zu Nebenreaktionen, die zu einem dreiphasigen Verlauf der Molekulargewichte und unregelmäßigen Verläufen der Substitutionsgrade gegenüber der Reaktionsdauer führen. Diese Unregelmäßigkeiten können durch die Imidazolkonzentration bedingt sein, weitergehende Untersuchungen müssen den vorgeschlagenen Mechanismus allerdings noch klären.

Bei der HESPEGMA-Herstellung zeigt sich ebenfalls ein unstetiger Verlauf der Molekulargewichte und Substitutionsgrade über die Reaktionsdauer. Um Reaktionsvorschläge wie im Fall der HESHEMA entwickeln zu können, müssen allerdings noch mehr HESPEGMA-Derivate hergestellt werden. Das Edukt PEGMACI weist allerdings eine geringere Tendenz zur Autopolymerisation bei der Aufarbeitung auf, so dass eine reproduzierbare Polymerherstellung für größere Probenmengen möglich erscheint.

Bei der HESMA-Herstellung ergibt sich ein stetiger Zuwachs des Substitutionsgrades mit der Reaktionsdauer. Diese Reaktion lässt sich sehr gut reproduzieren, so dass die Produktion größerer Probenmengen problemlos sein sollte. Ein weiterer Vorteil ist, dass das Edukt Glycidylmethacrylat kommerziell erhältlich und somit in gleich bleibender Qualität zugänglich ist, was die Reproduzierbarkeit gewährleistet. Bei diesen Proben nimmt das Brechungsindexinkrement mit zunehmendem Substitutionsgrad ab, wodurch sich von diesen hochsubstituierten Proben mittels GPC-MALS keine Molekulargewichte bestimmen lassen. Die Proben mit größerem DS lassen sich in THF lösen und fallen in Isopropanol aus, was darauf hindeutet, dass es sich weiterhin um Polymere handelt und es nicht zum Abbau

gekommen ist. Bei diesen Proben ist es somit notwendig, das Molekulargewicht mit Methoden wie Osmometrie oder Viskosimetrie zu bestimmen, die unabhängig vom Brechungsindexinkrement sind. Diese Messungen wurden jedoch aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

Bei allen drei Polymeren kommt es zur Abnahme der Wasserlöslichkeit mit zunehmenden DS. Dies ist im Falle der HESPEGMA-Derivate unerwartet, da die Wasserlöslichkeit durch die Substitution mit den hydrophilen Ethylenoxid-tragenden Gruppen erhöht werden sollte. Diese Beobachtung muss allerdings in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Die HESMA- und HESPEGMA-Polymere sind besser wasserlöslich als die HESHEMA-Derivate. Mit diesen Polymeren lassen sich auch 20 wt.% Lösungen herstellen. HESHEMA zeigt auch bei 10 wt.% Lösungen teilweise Löslichkeitsprobleme, so dass die daraus hergestellten Hydrogele inhomogen sind. Diese Löslichkeitsprobleme treten bei den HESHEMA-Polymeren aus der dritten Phase der Herstellung (Reaktionsdauer länger als 95 h) auf, bei der die vermutete Kopplung von HESHEMA-Polymeren über die Methacrylatgruppe das Molekulargewicht erhöht und die Wasserlöslichkeit herabsetzt. Aus diesen Gründen wurden in den Freisetzungsforschungen der weiterführenden pharmazeutischen Arbeiten¹⁰⁴ nur HESHEMA-Derivate eingesetzt, die aus der ersten Phase der HESHEMA-Herstellung stammen und die vollständig wasserlöslich sind.

HESHEMA und HESMA zeigen unter enzymatischem Abbau durch α -Amylase bei entsprechend langer Abbaudauer Abbauprodukte, die das gleiche hydrodynamische Volumen aufweisen wie die Abbauprodukte der Hydroxyethylstärke. Die dabei entstehenden drei Fraktionen bestehen aus zwei Hauptfragmenten mit einem Molekulargewicht (relativ zu Pullulan) von ca. 32000 und 4000 g/mol und einer sehr kleinen Fraktion mit ca. 200 g/mol. Da das verwendete Enzym nur die α -1,4-Verknüpfungen aufbricht, die zugänglich sind, zeigt das Aufspalten in drei Fragmente, dass es zwei Hauptblöcke gibt, die zum einen α -1,6-Verknüpfungen aufweisen und deren Substituenten den Abbau der α -1,4-Verknüpfungen behindern. Der geringe Anteil mit einem sehr kleinen hydrodynamischen Volumen besteht aus unsubstituierten Mono- oder Dimeren, die diese Hauptblöcke miteinander verbinden. Der enzymatische Abbau von HESPEGMA wurde noch nicht untersucht.

Aus den vorgestellten Polymeren lassen sich Hydrogele herstellen, deren Eigenschaften im Folgenden gegenüber gestellt werden.

Auf Grund der schon erwähnten besseren Wasserlöslichkeit von HESMA und HESPEGMA lassen sich auch höhere Konzentrationen einsetzen, um Hydrogele zu bilden. Dieser Effekt

wurde an HESMA-Polymeren untersucht. Dabei ergibt sich der erwartete Verlauf: je höher die Polymerkonzentration, desto geringer sind die \overline{M}_c -Werte. Dieser Effekt ist auch für die beiden anderen Polymerarten denkbar, wurde allerdings nur an den HESMA-Polymeren untersucht. Die Polymere wurden standardmäßig in 10 wt.% Lösungen in 0,01 wt.% Igarcure 2959 in Wasser hergestellt und mit 3-5 mW/cm² bestrahlt. Die Geleigenschaften aller Polymerarten können durch die Konzentration des Photoinitiators und die Belichtungsdauer variiert werden. Je höher die Photoinitiatorkonzentration ist, umso geringer sind die \overline{M}_c -Werte, wie es am Beispiel für die HESMA-Derivate vorgestellt wurde. Die Variation der Belichtungsdauer zeigt bei allen Gelen nach 15 Minuten Bestrahlung keinen Unterschied in den Quellungs- und Rheologiemessungen. Die sehr viel sensitivere Magnetrelaxometrie kann aber noch Unterschiede detektieren, wie es für die HESHEMA gezeigt wurde. Für diese neue Art der Hydrogelcharakterisierung muss allerdings noch eine entsprechende Theorie entwickelt werden, um diese Ergebnisse mit klassischen Verfahren korrelieren zu können.

Bei den Gelen aus HESHEMA hängen die Geleigenschaften sowohl vom Substitutionsgrad und dem Molekulargewicht als auch von der Phase der HESHEMA-Herstellung ab. Je geringer der DS und je größer das Molekulargewicht der Polymere ist, umso größere \overline{M}_c -Werte ergeben sich. Diese Geleigenschaften spiegeln sich in den Freisetzungsraten wieder; je größer die \overline{M}_c -Werte sind, umso schneller wird aus diesem Matrixmaterial freigesetzt¹⁰⁴. Bei ersten Tests mit α -Amylase zeigt sich, dass die HESHEMA-Hydrogele durch das Enzym innerhalb von 336 h teilweise aber nicht vollständig abgebaut werden. Weitere Untersuchungen zur Abbaubarkeit der Hydrogele müssen allerdings noch vertieft werden, der erste Test mit α -Amylase ist aber viel versprechend.

Die Hydrogele aus HESPEGMA zeigen wie die Gele aus HESHEMA eine Abhängigkeit vom Zusammenspiel des Substitutionsgrades, dem Molekulargewicht und der Reaktionsdauer bei der HESPEGMA-Herstellung, sowie der Anzahl der Ethylenoxideinheiten. Wie bei HESHEMA ist ein unregelmäßiger Verlauf der \overline{M}_c -Werte als Funktion der Reaktionsdauer bei der Herstellung der Polymere zu beobachten. Der Einfluss der Spacerlänge der zusätzlichen Ethylenoxideinheiten auf die untersuchten Hydrogele ist allerdings deutlich. Je länger der Spacer, d.h. je größer die Anzahl der Ethylenoxideinheiten ist, desto beweglicher sind die Methacrylatgruppen und umso geringere \overline{M}_c -Werte ergeben sich aus den Rheologiemessungen. Mit der Zunahme der Ethylenoxideinheiten ändert sich allerdings auch die Hydrophilie des Polymers und somit der Flory-Polymer-Lösungsmittel-

Wechselwirkungsparameter χ_1 , was zu größeren \overline{M}_c -Werten in den Quellungsmessungen führt. Daher ist ein Vergleich der Hydrogeldaten aus Quellungsmessungen der unterschiedlichen HES-Derivate nicht möglich, da die jeweiligen χ_1 -Werte nicht vorliegen, und deren aufwändige Bestimmung¹⁴⁹ nicht erfolgt ist. Die Hydrogele HESPEGMA haben allerdings den Vorteil gegenüber HESHEMA-Hydrogelen, dass sie mit zunehmender Quellungsdauer hydrolytisch abgebaut werden. Aus diesen Gelen lassen sich ebenfalls erfolgreich Proteine freisetzen, wie erste Freisetzungsuntersuchungen zeigen¹⁵⁰.

Bei den Hydrogelen aus HESMA zeigt sich eine deutliche Korrelation zwischen dem Substitutionsgrad und dem Quellungsverhalten; je höher der DS ist, umso geringer sind die \overline{M}_c -Werte. Interessant ist der hydrolytische Abbau von HESMA-Hydrogelen mit geringem Substitutionsgrad. Die Vernetzungsdichte scheint Einfluss auf die hydrolytische Abbaubarkeit zu nehmen; je weniger Vernetzungspunkte vorliegen, umso besser lassen sich die Hydrogele hydrolytisch abbauen. Durch die Erhöhung in der Polymerkonzentration ergeben sich Hydrogele mit kleineren \overline{M}_c -Werten, so dass neben dem Substitutionsgrad auch die Polymerkonzentration als gute Stellschraube für die Beeinflussung der Geleigenschaften dienen kann. Diese Einstellmöglichkeit ist bei den anderen Polymeren auch gegeben, allerdings aufgrund der geringeren Wasserlöslichkeit nicht in so einem weiten Bereich wie bei der HESMA. Eine exakte Untersuchung dieser Einflussgröße muss in weiterführenden Messungen intensiviert werden. Für die HESMA-Polymere wurde zudem der Einfluss der Photoinitiatorkonzentration untersucht. Die Gele zeigen umso höhere \overline{M}_c -Werte, je geringer die Photoinitiatorkonzentration gewählt wird. Die Verringerung der Photoinitiatorkonzentration um den Faktor 10 führt bei gleich bleibender Polymerkonzentration zu \overline{M}_c -Werterhöhungen von 11000 auf 88000 g/mol. Diese einfache Form der Gelmodifizierung sollte in Zukunft stärker untersucht werden, um auf diesem Weg die Geleigenschaften den gewünschten Freisetzungseigenschaften anzupassen. Erste Abbauntersuchungen der HESMA-Hydrogele mit α -Amylase zeigen eine vergleichbar gute Abbaubarkeit wie die HESHEMA-Hydrogele. Diese Untersuchungen müssen allerdings noch vertieft werden, um diese Eigenschaft näher zu beleuchten.

Zum Vergleich der Geleigenschaften lassen sich auf Grund der schon erwähnten Problematik der unbekannten bzw. als konstant vorgegebenen Flory-Polymer-Lösungsmittel-Wechselwirkungsparameter χ_1 nur die Daten aus den Rheologiemessungen miteinander

vergleichen. Dabei lassen sich \overline{M}_c -Werte vergleichen, die über die Gleichung 42 ermittelt werden.

$$\overline{M}_c = \frac{\rho RT}{G + \frac{2\rho RT}{\overline{M}_n}} \quad (42)$$

Der Vergleich der Hydrogele aus den unterschiedlichen Polymeren liefert in Hinblick auf die \overline{M}_c -Werte folgende Daten (Tab. 5).

Tab. 5: \overline{M}_c -Werte der Hydrogele aus verschiedenen HES-Derivaten bei gegebenem Substitutionsgrad (DS) und Gewichtsmittel \overline{M}_w

Material	DS	\overline{M}_w [g/mol]	\overline{M}_c [g/mol]
HESHEMA	0,088 ± 0,01	217000 ± 12000	101000 ± 300
HESHEMA	0,110 ± 0,008	230000 ± 9200	101000 ± 2500
HESHEMA *	0,086 ± 0,003	152500 ± 8100	74900 ± 950
HESPEG4MA *	0,064 ± 0,001	184000 ± 8300	89000 ± 160
HESPEG8MA *	0,055 ± 0,006	137000 ± 7500	68100 ± 210
HESMA	0,101 ± 0,013	126000 ± 7600	61700 ± 660
HESMA *	0,08 ± 0,002	130000 ± 8400	61000 ± 600

* Hydrogele aus diesen Polymeren werden im Folgenden mit einander verglichen

Bei den gemessenen Proben ergibt sich allerdings ein Problem; es wurden keine Polymere mit gleichem Molekulargewicht \overline{M}_w verwendet. Diese Größe geht in die Bestimmung der \overline{M}_c -Werte mit ein (s. Gl. 42). Dadurch ergeben sich, wie sich bei den HESHEMA-Proben zeigt, allein schon durch größere Molekulargewichte \overline{M}_w bei ähnlichem Substitutionsgrad größere \overline{M}_c -Werte.

Um die unterschiedlichen Polymerarten miteinander vergleichen zu können, müssten Polymere mit gleichem Molekulargewicht zu Hydrogelen umgesetzt werden. Die gemessenen Hydrogele haben unterschiedliche Molekulargewichte \overline{M}_w bzw. \overline{M}_n , was den Vergleich erschwert. Werden die \overline{M}_n -Werte für alle Proben gleich gesetzt, sind keine signifikanten Unterschiede der \overline{M}_c -Werte zwischen den Polymerarten zu beobachten, da in der Gleichung

42 zur Bestimmung der \overline{M}_c -Werte die jeweiligen Molekulargewichte die dominierenden Einflussgrößen sind. Daher ist der Vergleich der Hydrogele aus den unterschiedlichen Polymerarten mit unterschiedlichen \overline{M}_w -Werten über die \overline{M}_c -Werte nicht sehr aussagekräftig. Interessanter ist daher der direkte Vergleich der Speichermodule der Hydrogele aus den unterschiedlichen Polymeren (mit * gekennzeichnet) hinsichtlich der Länge der Ethylenoxideinheiten zwischen dem Hydroxyethylstärkerückgrat und der vernetzbaren Methacrylatgruppe. Der Unterschied zwischen dem Carbonatester und der Esteranbindung wird dabei vernachlässigt.

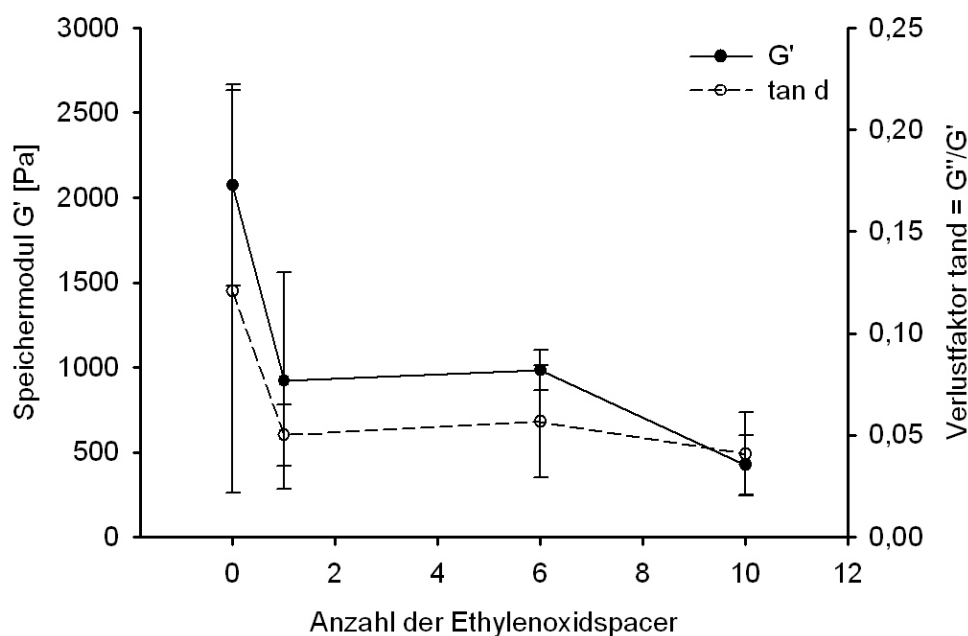


Abb. 75: Veränderung der Speichermodule G' bzw. Verlustfaktoren $\tan \delta$ mit der Zunahme der Anzahl der Ethylenoxidspacer zwischen Polymerrückgrat und Methacrylatgruppe

Mit zunehmender Spacerlänge zwischen der Methacrylatgruppe und dem HES-Rückgrat nimmt der Speichermodul G' ab. Der Verlustfaktor $\tan \delta$, der Quotient aus Speichermodul und Verlustmodul, nimmt ebenfalls ab. Somit werden die viskosen Eigenschaften der Hydrogele mit zunehmender Ethylenoxidspacerlänge stärker dominanter. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass mit der Zunahme der Ethylenoxideinheiten der Abstand zwischen den HES-Ketten größer wird und folglich die Ketten leichter bei der oszillierenden Messbewegung gegeneinander geschert werden können. Die HESMA-Derivate ohne Ethylenoxideinheiten und die Anbindung über die Estergruppe zeigen relativ große

Speichermodul, das Material ist demnach elastischer als die übrigen Hydrogele. Ob dieser Effekt bei gleichen Molekulargewichten auch auftritt, ist mit der Synthese von weiteren Polymeren mit gleichen Molekulargewichten zu überprüfen. Unter der Vorgabe, dass der Speichermodul und das Molekulargewicht proportional zueinander sind, lassen sich die Speichermodulwerte mit dem gleichen Faktor dividieren, mit dem bei den \overline{M}_w -Werten ein einheitliches Molekulargewicht von 130000 g/mol erhalten wird (\overline{M}_w -Wert der verwendeten HESMA-Probe) (Abb. 76):

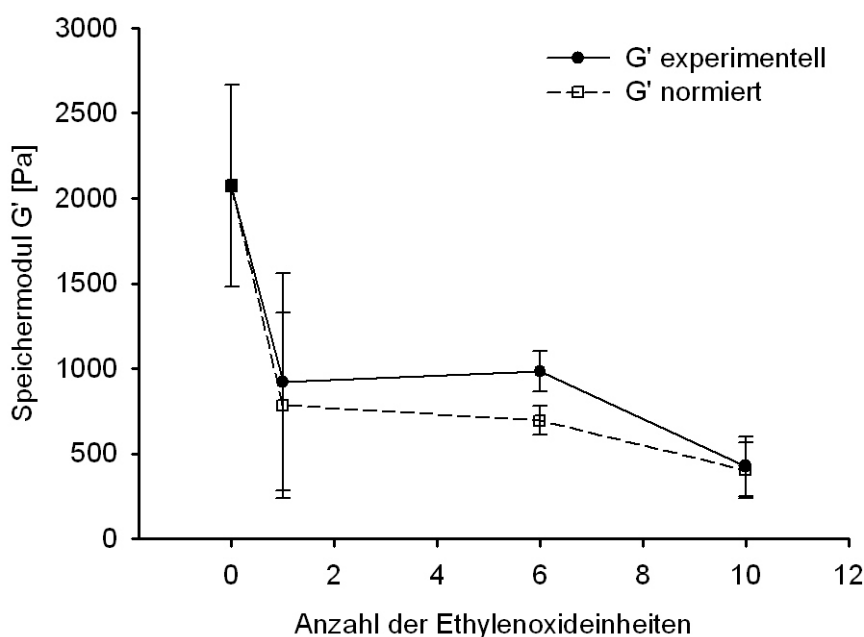


Abb. 76: Vergleich der Speichermodule der experimentellen Daten mit denen der auf 130000 g/mol normierten gegenüber der Anzahl an Ethylenoxidspacer zwischen Polymerrückgrat und Methacrylatgruppe

Auch die normierten Werte zeigen das gleiche Bild, mit Zunahme der Ethylenoxidspacer nimmt der Speichermodul ab, die viskosen Eigenschaften der viskoelastischen Hydrogelkörper folglich zu. Dieses Ergebnis widerspricht der Aussage in Kapitel 4.1.3, dass mit zunehmenden Ethylenoxidspacereinheiten die Beweglichkeit der Substituenten größer ist und somit engere Maschen und größere Speichermodule erhalten werden können. Um diese Diskrepanz zu klären, müssen daher in Zukunft mehr Polymere mit gleichem Molekulargewicht hergestellt werden, um den Einfluss der Spacerlänge besser zu beleuchten. Daher lassen sich die verschiedenen HES-Derivate nicht genau miteinander vergleichen, da die Ausgangsparameter zu stark variieren. Es zeigt sich allerdings generell, dass mit Zunahme

der Spacerlänge Hydrogele entstehen, die viskoser sind und mehr Wasser aufnehmen können. Auch die Unterschiede zwischen den Ester und Carbonatesterverbindungen sind deutlich, Die HESMA-Gele mit der Esterbindung sind elastischer bzw. geringer viskos als die HESHEMA- und HESPEGMA-Gele.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In den vorgestellten Arbeiten zeigt sich, dass durch die Modifikation von Hydroxyethylstärke mit Methacrylatgruppen Polymere zugänglich sind, die sich zu Hydrogelen umsetzen lassen.

Die Derivate, die auf HESHEMA basieren, lassen sich als Basismaterial für DDS einsetzen. Die Polymere bilden mit Polyethylenglycol ein wässriges Zwei-Phasensystem aus und lassen sich daher zur Einbindung von Proteinen in Mikrosphären unter sehr milden Bedingungen nutzen. Allerdings erschwert die Aktivierung via Carbonyldiimidazol und das somit sehr reaktive Edukt die kontrollierte und reproduzierbare Herstellung von großen Mengen an HESHEMA. Zudem besteht kein einfach linearer Zusammenhang zwischen den Polymer- und den Hydrogeleigenschaften.

Die Arbeiten zeigen, dass die HESHEMA-Synthese sehr viel komplexer ist als zunächst angenommen und durch ein Zusammenspiel mehrerer Parameter beeinflusst wird. Dieses erfordert neue Wege der Herstellung von HESHEMA oder neuer Polymere als Basismaterial für DDS. Der zuletzt genannte Weg wurde mit der Entwicklung der neuen Polymere HESPEGMA und HESMA beschritten.

Die HESPEGMA-Polymere sind hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit besser geeignet als die HESHEMA-Derivate. Durch die geringere Aktivität des Edukts PEGMACI lässt sich dieses besser aufreinigen und dadurch reproduzierbarer herstellen. Die bisher untersuchten Proben weisen allerdings auch einen nicht lineareren Verlauf des Substitutionsgrades über die Reaktionsdauer auf, wie es auch bei den HESHEMA-Derivaten zu beobachten ist. Die Hydrogele aus HESPEGMA lassen sich neben den üblichen Einstellgrößen wie Substitutionsgrad, Belichtungsdauer, Polymer- und Photoinitiatorkonzentration zudem noch durch die Anzahl der Ethylenoxidspace variieren. Diese Gele sind auch hydrolytisch abbaubar, was ihnen einen enormen Vorteil gegenüber den HESHEMA-Hydrogelen verschafft, deren enzymatische Abbaubarkeit aber gegeben ist.

Durch das Beibehalten der CDI-Chemie von der HESHEMA- bei der HESPEGMA-Herstellung ergeben sich die gewünschten Carbonatesterverbindungen, allerdings unter den schon erwähnten Nachteilen in der Synthese. Einfacher lässt sich die Anbindung der Methacrylatfunktion bei der HESMA-Herstellung realisieren, dabei kommt es aber zur Ausbildung einer Esterbindung. Somit ist eine, hinsichtlich der Anbindung der Vernetzungsfunktion, andere Polymerart entwickelt worden, die sich in Betrachtung auf die Abbaubarkeit von den Carbonatesterfunktionen tragenden Polymeren unterscheiden sollte. Die HESMA-Derivate zeigen allerdings den erhofften einfachen Zusammenhang zwischen

Substitutionsgrad und Hydrogeleigenschaften. Zudem weisen sie eine höhere Wasserlöslichkeit als die HESHEMA-Derivate auf, wodurch stabilere Gele zugänglich sind. Mit geringem Substitutionsgrad sind die Hydrogele auch hydrolytisch abbaubar. Als einziger Nachteil dieser HES-Modifikation ist die Abnahme des Brechungsindexinkrements mit zunehmendem Substitutionsgrad zu nennen, die die Molekulargewichtsbestimmung über GPC-MALLS erschwert. Durch andere Bestimmungsverfahren wie Osmometrie oder Viskosimetrie sollten hier verlässlichere Daten gewonnen werden können. Wie sich die Änderung von Carbonatester- zur Esteranbindung der vernetzbaren Gruppe auswirkt, muss allerdings noch in Abbauuntersuchungen geklärt werden. Bei Dextranen sind dexMA-Derivate deutlich stabiler als dexHEMA-Derivate¹⁷, allerdings weist die hydrolytische Abbaubarkeit der HESMA-Derivate mit niedrigem DS, die bei HESHEMA-Hydrogelen nicht gefunden wurde, in die entgegengesetzte Richtung. Der Weg der HESMA ist somit viel versprechend, da kontrolliert Polymere hergestellt werden können, deren Hydrogele auch abbaubar sind.

Mit den neuen Polymeren HESPEGMA und HESMA sind Materialien entwickelt worden, die das schon vielversprechende Potential der HESHEMA für den Einsatz als Basismaterial als Drug Delivery System für therapeutische Proteine noch übertreffen können. Damit deren Potential weiter untersucht werden kann, sollten in Zukunft die Synthese dieser Polymere und die Charakterisierung der daraus zu formenden Hydrogele vertieft werden. Zudem sollte das neue Instrument zur Hydrogelcharakterisierung, die Magnetrelaxometrie, weiter untersucht und eine Theorie entwickelt werden, die die Messergebnisse mit den Standardverfahren vergleichen lässt. Mit dieser Methode könnte es zudem generell möglich sein, auch *in vivo* den Abbau von Hydrogelen zu untersuchen, was solche Abbauuntersuchungen enorm vereinfachen und Kosten herabsetzen würde.

7. Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Chemikalien

7.1.1 Lösungsmittel

Substanz	Hersteller	Reinheitsgrad
Essigsäureethylester		Techn.
Dimethylformamid	Acros	HPLC grade
Dimethylsulfoxid	Fluka	puriss.
Tetrahydrofuran	Fischer	HPLC grade

Essigsäureethylester und Tetrahydrofuran wurden über Natrium getrocknet und destilliert¹⁵¹. Die übrigen Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

7.1.2 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheitsgrad
1, 1'-Carbonyldiimidazol	Fluka	Purum
Chloroform-d	Roth	≥99,75 %; mit 0,05 % Tetramethylsilan Zugabe
Deuteriumoxid	Aldrich	99,9 atom% D
Dimethylaminopyridin	Fluka	puriss.
2, 6-Ditert-butyl-4-methylphenol (Paracresol)	Aldrich	
Glycidylmethacrylat	Aldrich	97 %
Hydroxyethylmethacrylat	Fluka	puriss.
Hydroxyethylstärke	Fresenius	$\overline{M}_w = 130 \pm 20 \text{ kg/mol}$, DS= 0,36-0,40, MS= 0,38-0,45
Igarcure 2595	Ciba	
Kaliumbromid		
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen	p.a.

Magnesiumsulfat	Roth	wasserfrei
Natriumazid	Fluka	Purum p.a. $\geq 99\%$
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Acros	p.a.
Polyethylenglycolmethacrylat	Aldrich	
Tetramethylsilan	Fluka	$\geq 99,5\%$ (GC)

7.2 Hydroxyethylmethacrylatimidazol (HEMACI)

In einem 500 mL Zweihalskolben werden bei Raumtemperatur unter Stickstoff 25,952 g (0,16 mol) 1,1'-Carbonyldiimidazol in 350 mL Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von 20,816 g (0,16 mol) 2-Hydroxyethylmethacrylat wird die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Vor der Aufarbeitung werden zu der leicht gelben Lösung 1,763 g (0,008 mol) Paracresol hinzugegeben. Diese Lösung wird eingengt. Zu dem erhaltenen gelblichen Öl wird 240 mL Essigsäureethylester gegeben. Nachdem die Lösung zehnmal mit jeweils 20 mL destilliertem Wasser extrahiert wurde, wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und Essigsäureethylester im Vakuum entfernt, und es ergibt sich das gewünschte Produkt Hydroxyethylmethacrylat-carbonylimidazol mit geringen Spuren an Hydroxyethylmethacrylat und Paracresol.

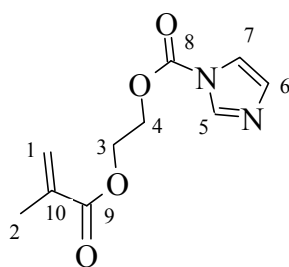


Abb. 77: Hydroxyethylmethacrylatcarboxylimidazol (HEMACI)

Ausbeute: 20,18 % (0,032 mol; 7,39 g)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, δ in ppm):

8.06 (m, 1H, H_5), 7.35 (m, 1H, H_7), 7.00 (m, 1H, H_6), 6.05 (m, 1H, $\text{H}_{1'}$), 5.54 (m, 1H, $\text{H}_{1'}$), 4.57 (m, 2H, H_4), 4.43 (m, 2H, H_3), 1.86 (m, 3H, H_2).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz, δ in ppm):

166.8 (C_9), 148.4 (C_8), 137.0 (C_{10}), 135.5 (C_5), 117.0 (C_6), 116.0 (C_7), 114.6 (C_1), 65.7 (C_3), 61.6 (C_4), 18.1 (C_2)

MS:

224 (M^+ , 5); 113 (100); 95 (11); 69 (97); 41(60)

7.3 Hydroxyethylstärkehydroxyethylmethacrylat (HESHEMA)

In einem 2 L-Dreihalskolben werden bei Raumtemperatur unter Stickstoff 71,12 g (0,4 mol) Hydroxyethylstärke (HES) in einem Gemisch aus 1400 ml Dimethylformamid und 250 mL Dimethylsulfoxid gelöst. Nach 30 Minuten wird 12,22 g (0,1 mol) des Katalysators Dimethylaminopyridin (DMAP) hinzu gegeben. Nach Zugabe von 22,42 g (0,1 mol) des Substituenten Hydroxyethylmethacrylatcarbonylimidazol wird die Lösung bei Raumtemperatur unter Stickstoff für 5 Tage gerührt. Proben, die zu unterschiedlichen Zeiten entnommen werden, werden für 3,5 Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO 12000 g/mol) und daraufhin gefriergetrocknet. Dabei entsteht ein weißer, watteartiger Feststoff mit glänzenden Bruchkanten. Diese Reaktion wurde mehrmals mit unterschiedlichen Verhältnissen Substituent (HEMACI) zu RU (HES) durchgeführt. Die Ausbeuten und die spektroskopischen Daten aller Hydroxyethylstärkehydroxyethylmethacrylate ähneln sich sehr, und sind am Beispiel des Verhältnisses RU/Substituent 10 zu 1 wiedergegeben.

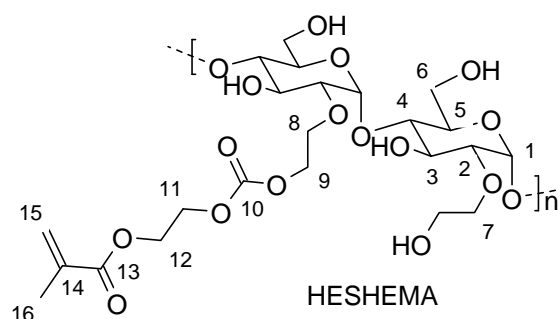


Abb. 78: Hydroxyethylstärkehydroxyethylmethacrylat (HESHEMA)

Ausbeute: 45,6 % (48,3 g)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, δ in ppm):

6.2 (s, 1H, H_{15}), 5.8 (s, 1H, H_{15}), 5.7-5.1 (m, H_1 der HES), 4.6-4.35 (m, 4H, H_{11} und H_{12}), 4.35-2.4 (m, H_2 - H_6 der HES und H_7 , Alkylprotonen der Ethylgruppe des Hydroxyethylsubstituenten), 2.15-1.65 (m, 3H, H_{16})

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz, δ in ppm):

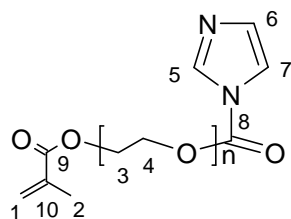
170,5 (C_{13}); 158.4 (C_{10}); 138.5 (C_{14}); 130.2 (C_{15}); 102.5 und 99.6 (C_1); 82.6 und 79.6 (C_3); 76.2 – 72.2 (C_8), (C_7), (C_{11}) und (C_{12}); 63.6 (C_6); 63.3 (C_9); 20.5 (C_{16})

IR (KBr-Pressling, gegen Luft, ν in cm^{-1}):

3423 (s, OH), 2927 (s, C-H-Valenz), 1749 (w, C=O-Valenz, Vinylester, C=C-COOR), 1638 (m, C=C-Valenz), 1158(s, C-O-Valenz, Hydroxygruppe)

7.4 Polyethylenglycolmethacrylatimidazol (PEGMACI)

In einem 250 mL Zweihalskolben werden bei Raumtemperatur unter Stickstoff 3,244 g (20 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol in 160 mL Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von 7,2 g (20 mmol) Polyethylenglycolmethacrylat ($M_n \sim 360$ g/mol) und Spülen mit 20 mL Tetrahydrofuran wird die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Vor der Aufarbeitung wird zu der leicht gelben Lösung eine Spatelspitze Paracresol hinzu gegeben. Diese Lösung wird eingeeengt. Die erhaltene klare gelbe Lösung wird in Essigsäureethylester gelöst und mit destilliertem Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und Essigsäureethylester wird im Vakuum entfernt. Dabei ergibt sich das gewünschte Produkt Polyethylenglycolmethacrylat-carbonylimidazol mit geringen Spuren an Hydroxyethylmethacrylat und Paracresol.



PEGMACI, $n = 10$ oder 6

Abb. 79 Polyethylenglycolmethacrylatimidazol (PEGMA-Cl)

Ausbeute: 54,8% (10,9 mmol; 4,87 g)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, δ in ppm):

8.16 (m, 1 H, H_5), 7.45 (m, 1 H, H_7), 7.07 (m, 1 H, H_6), 6.12 (m, 1 H, $\text{H}_{1'}$), 5.57 (m, 1 H, $\text{H}_{1'}$), 4.29 (m, 2 H, H_3), 3.88 – 3.59 (m, 30 H, H_3 und 4), 1.94 (m, 3 H, H_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz, δ in ppm):

166.7 (C_9), 148.4 (C_8), 136.9 (C_{10}), 135.7 (C_5), 116.9 (C_1), 70.4 (C_3 und 4), 18.1 (C_2).

7.5 Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat (HESPEGMA)

In einem 500 mL-Dreihalskolben werden bei Raumtemperatur unter Stickstoff 9,46 g (53,2 mmol) Hydroxyethylstärke (HES) in 250 mL Dimethylsulfoxid gelöst. Nach 30 Minuten wird 1,29 g (10,6 mmol) des Katalysators Dimethylaminopyridin (DMAP) hinzu gegeben. Nach Zugabe von 4,73 g (10,6 mmol) des Substituenten Polyethylenglycolmethacrylatcarbonylimidazol (PEGMA-CI) wird die Lösung bei Raumtemperatur unter Stickstoff für 5 Tage gerührt. Proben, die zu unterschiedlichen Zeiten entnommen werden, werden für 3,5 Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO 12000 g/mol) und daraufhin gefriergetrocknet. Dabei entsteht ein weißer, watteartiger Feststoff mit glänzenden Bruchkanten. Diese Reaktion wurde sowohl mit Polyethylenglycolmethacrylatcarbonylimidazol (PEGMA-CI) mit $n=6$ Ethylenoxideinheiten als auch mit Polyethylenglycolmethacrylatcarbonylimidazol (PEGMA-CI) mit $n=10$ Ethylenoxideinheiten durchgeführt. Die Ausbeuten und die spektroskopischen Daten aller Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylate ähneln sich sehr, und sind daher am Beispiel des Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylats mit $n=6$ Ethylenoxideinheiten wiedergegeben.

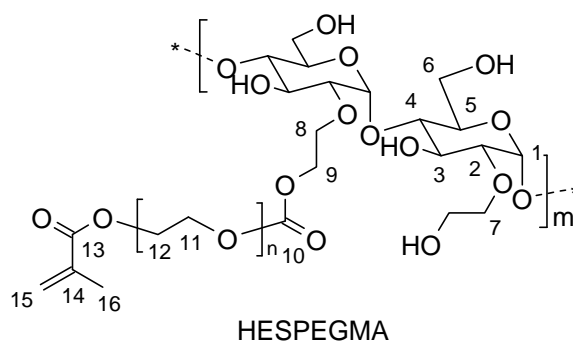


Abb. 80: Hydroxyethylstärke-Polyethylenglycolmethacrylat (HESPEGMA) mit $n=6$ und $n=10$

Ausbeute: 67,7 % (9,12 g)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm):

6.2 (s, 1H, H₁₅), 5.78 (s, 1H, H₁₅), 5.7-5.1 (m, H₁ der HES), 4.6-4.35 (m, 24H, H₁₁ und H₁₂), 4.35-2.4 (m, H₂-H₆ der HES und H₇, H₈, H₉ und H₁₁ Alkylprotonen der Ethylgruppe des Hydroxyethylsubstituenten), 2.15-1.65 (m, 3H, H₁₆)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, δ in ppm):

138.5 (C₁₄); 130.2 (C₁₅); 102.5 und 99.6 (C₁); 82.6 und 79.6 (C₃); 76.2 – 72.2 (C₇), (C₈), (C₁₀) und (C₁₁); 63.6 (C₆); 63.3 (C₉); 20.5 (C₁₆)

7.6 Hydroxyethylstärkemethacrylat (HESMA)

In einem 1 L-Dreihalskolben werden bei Raumtemperatur unter Stickstoff 10,98 g (61,7 mmol) Hydroxyethylstärke (HES) in 450 mL Dimethylsulfoxid gelöst. Nach 30 Minuten wird 2 g (16,4 mmol) des Katalysators Dimethylaminopyridin (DMAP) hinzu gegeben. Nach Zugabe von 4,63 g (32,6 mmol) Glycidylmethacrylat wird die Lösung bei Raumtemperatur unter Stickstoff für 5 Tage gerührt. Proben, die zu unterschiedlichen Zeiten entnommen werden, werden für 3,5 Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO 12000 g/mol) und daraufhin gefriergetrocknet. Dabei entsteht ein weißer, watteartiger Feststoff. Diese Reaktion wurde mit unterschiedlichen Verhältnissen an Glycidylmethacrylat zu Hydroxyethylstärke durchgeführt. Die Ausbeuten und die spektroskopischen Daten aller Hydroxyethylstärkemethacrylate ähneln sich sehr, und sind daher am Beispiel des Hydroxyethylstärkemethacrylats mit einem HES:GMA Verhältnis von 2:1 wiedergegeben.

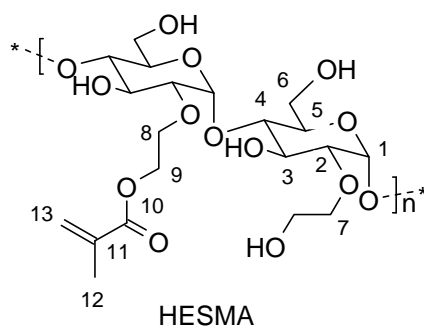


Abb. 81: Hydroxyethylstärkemethacrylat

Ausbeute: 79,4 % (10,49 g)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, δ in ppm):

6.3 (s, 1H, H₁₃), 5.8 (s, 1H, H₁₃), 5.7-5.1 (m, H₁), 4.6-4.35 (m, 4H, H₈ und H₉), 4.35-2.4 (m, H₂-H₆ der HES und H₇, Alkylprotonen der Ethylgruppe des Hydroxyethylsubstituenten), 2.15-1.65 (m, 3H, H₁₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, δ in ppm):

165.8 (C₁₀), 137.1 (C₁₃), 130.4 (C₁₁), 103.4, 102.8 und 100.3 (C₁), 83.2 und 82.8 (C₃), 82.1 und 80.1 (C₂), 76.8 und 76.6 (C₇), 75.8 – 74.3 (C₈), 64.3 (C₆), 64.1 (C₉), 63.8 (C_{6 unsubst.}), 18.5 (C₁₂)

7.7 Verwendete Geräte und Methoden

7.7.1 NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren wurden an einem DRX 400 beziehungsweise AV 300 der Firma Bruker mit einer Magnetfeldstärke von 9,4 T im NMR-Labor des Chemischen Instituts der Technischen Universität Braunschweig aufgenommen. Für die ¹H-NMR Spektren wurden bei Frequenzen von 300 beziehungsweise 400 MHz und für ¹³C-NMR bei 100 MHz gemessen. Die Peaks wurden dabei relativ zum verwendeten deuterierten Lösungsmittel ausgewertet. Die Probenmenge lag dabei zwischen 20 und 100 mg gelöst in 0,7-0,8 mL deuteriertem Lösungsmittel, welche im experimentellen Teil angeführt sind.

7.7.2 UV-Belichtung

Für die Photovernetzung wurde eine HP-UV/VIS-Lampe der Fa. Desaga mit einer Strahlungsintensität von 3,5 mW/cm² und einer Wellenlänge von 356 nm verwendet. Es wurde dabei senkrecht von oben mit einem Abstand von 1 cm für eine Dauer von 30 Minuten belichtet.

7.7.3 Gelpermeationschromatographie

Die Polymere wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL in entgastem Milliporewasser gelöst, welches zum Schutz vor Keimen 0,02 wt.% Natriumazid enthält. Die Messapparatur besteht aus einer Merck HITACHI L6000A Pumpe, einem DAWN DSP Lichtstreuendetektor der Fa. Wyatt (Santa Barbara, USA) und einem Differential Refraktometer des Typs RI-101 der Fa. Shodex (Tokio, Japan). Die Messung fand bei 40 °C und einer Flussrate von 0,5 mL/min statt. Es wurden eine PL-aquagel-OH Guard sowie 2 PL aquagel-OH Mixed Säulen verwendet.

7.7.4 Hydrogeluntersuchungen

Die Hydrogele wurden mittels Quellungs-, Rheologie- und Magnetrelaxometrie-Messungen untersucht. Dazu wurde jeweils eine 0,01 wt.% Lösung des Photoinitiators Igarcure 2959 in Wasser (aqua dest.) hergestellt. Mit dieser Lösung wurden 10 wt.% Lösungen mit HESHEMA, HESPEGMA und HESMA hergestellt. Mit HESMA wurden auch 20 wt.% Lösungen hergestellt.

7.7.4.1 Quellung

Für die Quellungsmessungen wurden mit der jeweiligen Polymerlösung mindestens drei Hydrogelkörper hergestellt. Dazu wurde jeweils ca. 150 µL Polymerlösung in 200 µL Mikrotitergefäße aus Polystyrol (nunc-Immuno, Typ BreakApart, Polysorb) gegeben und diese mit einer UV-Lampe (366 nm, 3,5 mW/cm²) bestrahlt. Die Startmasse des Hydrogelszylinder wurde mittels Waage (OHAUS, Adventurer, Messungenauigkeit ±0,1 mg) bestimmt. Die Gelkörper wurden in Wasser (aqua dest.) bei Raumtemperatur gelagert und in regelmäßigen Abständen gewogen. Dazu wurden die Gelkörper einzeln auf einem Filterpapier gewogen. Das Wasser auf der Oberfläche der Gelkörper wurde mit dem Filterpapier abgenommen. Die Masse des Oberflächenwassers wurde durch Wiegen des Filterpapiers bestimmt und von der vorher bestimmten Masse des Gelkörpers subtrahiert. Wenn die Massenkonstanz der Gelkörper erreicht ist, wird der Gelkörper in flüssigem Stickstoff (-78°C) eingefroren und lyophilisiert. Die Masse der dabei erhaltenen weißen, harten Gelkörper wird durch Wägung bestimmt. Durch die Division der Masse der gequollenen Gele durch die

Trockenmasse ergibt sich die massenbezogene Quellungsrate q , die in der Gleichung 5 zur Bestimmung der volumenbezogenen Quellungsrate Q eingesetzt werden kann (s. Kap 2.3.1).

7.7.4.2 Rheologie

Die Oszillationsmessungen wurden an einem RheoStress[®] RS100 Messsystem der Firma Haake (Karlsruhe, Deutschland) bei 25 °C durchgeführt. Es wurde eine Platte-Platte Messgeometrie (Durchmesser: 20 mm, Plattenabstand 1,3-1,7 mm) verwendet. Die Messung erfolgte mit dem RheoWin 3.61.0004 Job Manager. Die Auswertung erfolgte mit dem RheoWin 3.61.0004 Data Manager. Die Probe wurde wie in Kap. 3.3.2 beschrieben hergestellt. Dabei wurde pro Probenkörper jeweils 400 µL sowohl 10 wt.% bzw. 20 wt.% Polymerlösungen verwendet.

7.7.4.3 Magnetrelaxometrie

Die Magnetrelaxometriemessungen wurden am MRX-Forschungssystem des Instituts für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt. Der Aufbau, die Messungen und die Auswertungen der MRX-Signale wurden von Herrn Dr. Erik Heim durchgeführt und sind detailliert in seiner Dissertation¹³⁹ wiedergegeben. Der Aufbau der Messapparatur besteht aus einem Helmholtz-Spulensystem zur Aufmagnetisierung der Probe und einer differentiellen Fluxgate-Anordnung (Abb. 82).

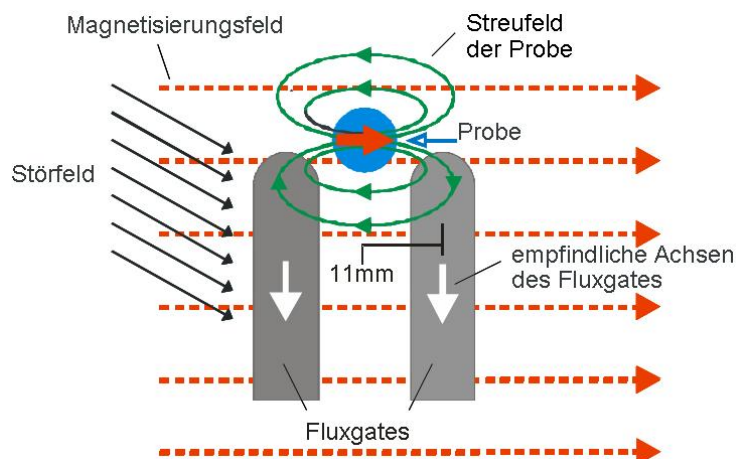


Abb. 82: Schematischer Messaufbau der Magnetrelaxometrie

Das Probengefäß wird zwischen den differentiell angeordneten Fluxgate-Sensoren platziert. Diese Sensoren sind mit ihrer empfindlichen Achse senkrecht zum homogenen Magnetisierungsfeld der Helmholtz-Spule angebracht. Dadurch können die Sensoren nur das Streufeld der Proben detektieren. Durch die differentielle Anordnung der Sensoren können Hintergrundsignale kompensiert werden und das Streufeld der Probe doppelt aufgenommen werden¹⁵². Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Zur Untersuchung der Hydrogele mittels MRX wurden jeweils 150 µL Polymerlösung in den 300 µL Mikrotitergefäße aus Polystyrol (nunc-Immuno, Typ BreakApart, Polysorb) vorgelegt und 0,7 µL MNP-Dispersion (fluidMAG-GA/GV, 75 mg/mL) zugemischt. Diese Lösungen wurden unterschiedlich lange UV-bestrahlt und daraufhin mit dem MRX-Aufbau bei Raumtemperatur gemessen. Als Brown-Referenz wird eine unbelichtete Hydrogelprobe verwendet. Als Néel-Referenz dient eine gefriergetrocknete Probe mit der verwendeten MNP-Dispersion gelöst in gesättigter D-Mannit-Lösung.

7.7.5 Enzymatischer Abbau

Für den enzymatischen Abbau wurde ein Sörensen-Puffer hergestellt. Dazu wurde 19,7 mL einer 1/15 mol/L KH_2PO_4 -Lösung mit 80,3 mL einer 1/15 mol/L $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung gemischt, wodurch sich ein pH-Wert von 7,4 ergibt. In 500 mL dieser Pufferlösung wurden 4,949 g 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (EC 3.2.1) (α -Amylase) (402 IU/mL) gelöst, wodurch sich eine Enzymkonzentration von 3,9 IU/mL ergab.

Von den Polymeren HES, HESHEMA und HESMA wurde jeweils 1 g vorgelegt und mit der Enzymlösung auf 5 g aufgefüllt. Diese Lösungen wurden bei 37 °C im Wasserbad gerührt. Proben für die GPC wurden nach unterschiedlichen Zeiten entnommen. Durch Erhitzen wurde das Protein denaturiert und abfiltriert (2 µm Spritzenfilter). Die Proben wurden gefriergetrocknet und mittels GPC untersucht.

Zur Untersuchung der enzymatischen Hydrogelabbaubarkeit wurden HESHEMA-Hydrogele und HESMA-Hydrogele untersucht. Diese wurden zum einen als 10 wt.%ige Lösung mit reinem Sörensen-Puffer pH 7,4 und 0,01 wt.% Irgacure 2959 hergestellt. Zum andern wurden sie als 10 wt.%ige Lösung mit 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (EC 3.2.1) (α -Amylase) (3,9 IU/mL) in Sörensen-Puffer pH 7,4 und 0,01 wt.% Irgacure 2959 hergestellt. Diese unbeladenen und beladenen Hydrogele wurden in einer Lösung von 1,4- α -D-Glucan-Glucanohydrolase (EC 3.2.1) (α -Amylase) (3,9 IU/mL) in Sörensen-Puffer pH 7,4 bei 37°C gelagert. Das Gewicht der Proben wurde zu unterschiedlichen Zeiten mittels der

Filtermethode (s. Kap. 7.7.4.1) bestimmt. Nach 336 Stunden Quelldauer wurden die Proben in flüssigem Stickstoff (-78 °C) eingefroren und lyophilisiert. Die Masse der dabei erhaltenen weißen, harten Gelkörper wird bestimmt. Durch die Division der Masse der gequollenen Gele durch die Trockenmasse ergibt sich die massenbezogene Quellungsrate q , die in der Gleichung 5 zur Bestimmung der volumenbezogenen Quellungsrate Q eingesetzt werden kann.

7.7.5.1 Kryo-SEM

Die Kryo-Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen S-4800 (Hitachi) wurden an der Universität Potsdam, Institut für Chemie, durchgeführt. Für die Kryo-REM-Aufnahmen wurden die Hydrogele hergestellt und in Wasser gelagert. Zur Präparation der zu untersuchenden Systeme wurden die Proben in schmelzendem Stickstoff unter Atmosphärendruck eingefroren, bei -180 °C gefriergebrochen, für 60 s bei -98 °C geätzt, mit Platin besputtert (Alto 2500, GATAN) und in das Kryo-REM überführt.

8. Literatur

1. Blohm, D.; Bollschweiler, C.; Hilten, H., Pharmaproteine. *Angew. Chem.* 1988, 100, 213-316.
2. Pavlou, A., K.; Reichert, J. M., Recombinant protein therapeutics - success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotech.* 2004, 22, 1513-1519.
3. Heinemann, A. *Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2008-Wirtschaftsdaten und Innovationskraft*; Boston Consulting Group GmbH: München, 2008; pp 1-48.
4. Goddard, P., Therapeutic proteins-a pharmaceutical perspective. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1991, 6, 103-131.
5. Arzneimittel aus dem Fermenter. 2009, roche Broschüre: Biotechnologie-neue Wege in der Medizin.
6. Petrus, A. K.; Fairchild, T. J.; Doyle, R. P., Orale Verabreichung von Protein- und Peptidwirkstoffen entlang der Vitamin-B12-Route. *Angew. Chem.* 2009, 121, 1040-1047.
7. Larrick, J., W., Potential of Monoclonal Antibodies as Pharmacological Agents. *Pharmacol. Rev.* 1989, 41, 539-557.
8. Peppas, N. A., *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. CRC Press, Inc: Boca Raton, 1986; Vol. 1.
9. Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, w.; Ichikawa, H., Hydrogels in pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000, 50, 27-46.
10. Manning, M. C.; Patel, K.; Borchardt, R. T., Stability of Protein Pharmaceuticals. *Pharm. Res.* 1989, 6, 903-918.
11. Beijerinck, M. W., Über Emulsionsbildung bei der Vermischung wässriger Lösungen gewisser gelatinierender Kolloide. *Colloid Polym Sci* 1910, 7, 16-20.
12. Gustafsson, A.; Wennerström, H.; Tjerneld, F., The nature of phase separation in aqueous two-polymer systems. *Polymer* 1986, 27, 1768-1770.
13. Dijk-Wolthuis, W. N. E. v.; Tsang, S. K. Y.; Kettenes-van den Bosch W.E. Hennink, J. J., A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer. *Polymer* 1997, 38, 6235-6242.
14. Franssen, O.; Hennink, W. E., A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents. *Int. J. Pharm.* 1998, 168, 1-7.
15. Stenekes, R. J. H.; Franssen, O.; Van Bommel, E. M. G.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W., The use of aqueous PEG/dextran phase separation for the preparation of dextran microspheres. *Int. J. Pharm.* 1999, 183, 29-32.
16. Stenekes, R. J. H.; Franssen, O.; Bommel, E. M. G. v.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E., The Preparation of Dextran Microspheres in an All-Aqueous System: Effect of the Formulation Parameters on Particle Characteristics. *Pharm. Res.* 1998, 15, 557-561.
17. Dijk-Wolthuis, W. N. E. v.; Steenbergen, M. J. v.; Underberg, W. J. M.; Hennink, W. E., Degradation Kinetics of Methacrylates Dextrans in Aqueous Solution. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 413-417.
18. Vlugt-Wensink, K. D. F.; Jiang, X.; Schotman, G.; Kruijtzter, G.; Vredenberg, A.; Chung, J. T.; Zhang, Z.; Versluis, C.; Ramos, D.; Verrijck, R.; Jiskoot, W.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E., In vitro Degradation Behavior of Microspheres Based on Cross-linked Dextran. *Biomacromolecules* 2006, 7, 2983-2990.
19. Scheibe, K., A new aqueous two phase system based on Hydroxyethylstarch and Polyethelenglycol. *Poster Proc. Annual meeting on the controlled release society local chapter Germany, Munich.* 2003.
20. Kulicke, W. M.; Roessner, D.; Kull, W., Characterization of Hydroxyethylstarch by Polymer Analysis for Use as a Plasma Volume Expander. *Starch/Stärke* 1993, 45, 445-450.
21. Lawin, P.; Zander, J.; Weidler, B., *Hydroxyethylstaerke - eine aktuelle Uebersicht*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 1989.

22. Heim, E.; Harling, S.; Pöhlig, K.; Ludwig, F.; Menzel, H.; Schilling, M., Fluxgate magnetorelaxometry of superparamagnetic nanoparticles for hydrogel characterization. *J. Magn. Magn. Mater.* 2007, 311, 150-154.
23. Scheibe, K. Hydrogele auf Basis von Hydroxyethylstärke als Drug Delivery System für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen. TU Braunschweig, Braunschweig, 2008.
24. Harling, S. Hydrogele auf Basis von Hydroxyethylstärke als Drug Delivery Systeme. Diplomarbeit. TU Braunschweig, Braunschweig, 2004.
25. Dijk-Wolthuis, W. N. E. v.; Hoogeboom, J. A. M.; Steenberg, M. J. v.; Tsang, S. K. Y.; Hennink, W. E., Degradation and Release Behavior of Dextran-based Hydrogels. *Macromolecules* 1997, 30, 4639-4645.
26. Flory, P. J.; J. Rehner, J., Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks. II. Swelling. *J. Chem. Phys.* 1943, 11, 521-526.
27. Flory, P. J., *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press: Ithaca, NY, 1953.
28. Kamath, K. R.; Park, K., Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1993, 11, 59-84.
29. Haraguchi, K.; Li, H.-J.-. Control of the Coil-to-Globule Transition and Ultrahigh Mechanical Properties of PNIPA in Nanocomposite Hydrogels. *Angew. Chem.* 2005, 117, 6658-6662.
30. Richter, A.; Krause, W.; Lienig, J.; Arndt, K.-F., Polymernetzwerke als Aktor-Sensor-Systeme für die Automatisierung biomedizinischer Geräte. *Biomed. Technik* 2005, 50, 66-68.
31. Kuckling, D.; Vo, C. D.; Adler, H.-J. P.; Völkel, A.; Cölfen, H., Preparation and Characterization of Photo-Cross-Linked Thermosensitive PNIPAAm Nanogels. *Macromolecules* 2006, 39, 1585-1591.
32. Meena, R.; Prasad, K.; Siddhanta, A. K., Development of a stable hydrogel network based on agar-kappe-carrageenan blend cross-linked with genipin. *Food Hydrocolloids* 2008, 23, 497-509.
33. Leach, J. B.; Schmidt, C. E., Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2005, 26, 125-135.
34. Kim, J.; Nayak, S.; Lyon, L. A., Bioresponsive Hydrogel Microlenses. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 9588-9592.
35. Meiring, J. E.; Schmid, M. J.; Grayson, S. M.; Rathsack, B. M.; Johnson, D. M.; Kirby, R.; Kannappan, R.; Manthiram, K.; Hsia, B.; Hogan, Z. L.; Ellington, A. D.; Pishko, M. V.; Willson, C. G., Hydrogel biosensor Array platform Indexed by Shape. *Chem. Mater.* 2004, 16, 5574-5580.
36. Du, J.-Z.; Sun, T. M.; Weng, S.-Q.; Chen, X.-S.; Weng, J., Synthesis and Characterization of Photo-cross-linked Hydrogels based on Biodegradable polyphosphoesters and Poly(ethylene glycol). *Biomacromolecules* 2007, 8, 3375-3381.
37. Jin, R.; Teixeira, L. S. M.; Dijkstra, P. J.; Karperien, M.; Van Blitterswijk, C. A.; Zhong, Z. Y.; Feijen, J., Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2009, 30, 2544-2551.
38. Bikram, M.; Fouletier-Dilling, C.; Hipp, J. A.; Gannon, F.; Davis, A. R.; Olmsted-Davis, E. A.; West, J. L., Endochondral Bone Formation Form Hydrogel Carriers Loaded with BMP2-transduced Cells. *Ann. Biomed. Eng.* 2007, 35, 796-807.
39. Chen, M. C.; Tsai, H. W.; Chang, Y.; Lai, W. Y.; Mi, F. L.; Liu, C. T.; Wong, H. S.; Sung, H. W., Rapidly Self-Expandable Polymeric stents with a Shape-Memory Property. *Biomacromolecules* 2007, 8, 2774-2780.
40. Chen, M. C.; Tsai, W. E.; Liu, C. T.; Peng, S. F.; Lai, W. Y.; Chen, S. J.; Chang, Y.; Sung, H. W., A nanoscale drug entrapment strategy for hydrogel-based systems for the delivery of poorly soluble drugs. *Biomaterials* 2009, 30, 2102-2111.
41. Nayak, S.; Lyon, L. A., Weiche Nanotechnologie mit weichen Nanopartikeln. *Angew. Chem.* 2005, 117, 7862-7886.

42. Missirlis, D.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A., Amphiphilic Hydrogel Nanoparticles. Preparation, Characterization, an Preliminary Assessment as New Colloidal Drug Carriers. *Langmuir* 2005, 21, 2605-2613.
43. Dziubla, T. D.; Torjman, M. C.; Joseph, J. J.; Murphy-Tatum, M.; Lowman, A. M., Evaluation of porous networks of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) as interfacial drug delivery devices. *Biomaterials* 2001, 22, 2893-2899.
44. Mahkam, M.; Doostie, L., The relation Between Swelling Properties an Cross-Linking of Hydrogels Designed for Colon-Specific Drug Delivery. *Drug Delivery* 2005, 12, 343-347.
45. Burdick, J. A.; Khademhosseini, A.; Langer, R., Fabrication of Gradient Hydrogels Using a microfluidics/photopolymerization Process. *Langmuir* 2004, 20, 5153-5156.
46. Kazakov, S.; Kaholek, M.; Kudasheva, D.; Teraoko, I.; Cowman, M. K.; Levon, K., Poly(N-isopropylacrylamide-co-1-vinylimidazole)Hydrogel Nanoparticles Prepared and Hydrophobically Modified in Liposome Reactors: Atomic Force Microscopy and Dynamic Light Scattering Study. *Langmuir* 2003, 19, 8086-8093.
47. Van Thienen, T. G.; Lucas, B.; Flesch, F. M.; Van Nostrum, C. F.; Demeester, J.; De Smedt, S. C., On the Synthesis and Characterization of Biodegradable Dextran Nanogels with Tunable Degradation Properties. *Macromolecules* 2005, 38, 8503-8511.
48. Thienen, T. G. V.; Raemdonck, K.; Demeester, J.; De Smedt, S. C., Protein Release from Biodegradable Dextran Nanogels. *Langmuir* 2007, 23, 9794-9801.
49. Hoffman, A. S., Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002, 43, 3-12.
50. Themistou, E.; Patrickios, C. S., Synthesis and Characterization of Polymer Networks and Star Polymers Containing a Novel, Hydrolyzable Acetal-Based Dimethacrylate Cross-linker. *Macromolecules* 2006, 39, 73-80.
51. Qiu, Y.; Park, K., Enviroment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001, 53, 321-339.
52. Wang, l.; Zhao, j.; Zhang, Q.; Han, Z., Thermo-Responsive Gels. *Polymer Preprints* 2005, 46, 847.
53. Reuber, J.; Reinhardt, H.; Johannsmann, D., Formation of Surface-Attached Responsive Gel Layers via Electrochemically Induced Free-Radical Polymerization. *Langmuir* 2006, 22, 3362-3367.
54. Rice, C. V., Phase-Transition Thermodynamics of N-Isopropylacrylamide Hydrogels. *Biomacromolecules* 2006, 7, 2923-2925.
55. Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003, 36, R167-R181.
56. Michelman-Ribeiro, A.; Boukari, H.; Nossai, R.; Horkay, F., Structural Changes in Polymer Gels Probed by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Macromolecules* 2004, 37, 10212-10214.
57. Mason, M. N.; Metters, A. T.; Bowman, C. N.; Anseth, K. S., Predicting Controlled-Release Behavior of Degradable PLA-b-PEG-b-PLA Hydrogels. *Macromolecules* 2001, 34, 4630-4635.
58. Huang, W.; Zhou, Y.; Yan, D., Direct syntesis of Amphiphilic Block Copolymers from Glycidyl methacrylate and Poly(ethylene glycol) by Cationic Ring-Opening polymerization and Supramolecular Self-Assembly thereof. *J. Polym. Sci. A: Polymer Chemistry* 2005, 43, 2038-2047.
59. Stelves, W. M.; Ankone, M. J. K.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J., Stereocomplex formation in ABA triblock copolymers of poly(lactide) (A) and poly(ethylene glycol) (B). *Macromol. Chem. Phys.* 1995, 196, 3687-3694.
60. Crescenzi, V.; Cornelio, L.; Di Meo, C.; Nardecchia, S.; Lamanna, R., Novel Hydrogels via Click Chemistry: Synthesis and Potential Biomedical Applications. *Biomacromolecules* 2007, 8, 1844-1850.
61. Peng, T.; Yao, K.; Yuan, C.; Goosen, M., Structural changes of pH-sensitive chitosan/polyether hydrogels in different pH solutions. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 1994, 32, 591-596.
62. Collin, D.; Lavallo, P.; Garza, J. M.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Martinoty, P., Mechanical Properties of cross-linked Hyaluronic Acid/Poly-(L-Lysine) Multilayer Films. *Macromolecules* 2004, 37, 10195-10198.

63. Mao, C.; Kisaalita, W. S., Characterization of 3-D collagen hydrogels for functional cell-based biosensing. *Biosen. Bioelectron.* 2004, 19, 1075-1088.
64. Chen, L.; Tian, Z.; Du, Y., Synthesis and pH sensitivity of carboxy methyl chitosan-base polyampholyte hydrogels for protein carrier matrices. *Biomaterials* 2004, 25, 3725-3732.
65. Ahmed, T. A. E.; Griffith, M.; Hincke, M., Characterization and Inhibition of Fibrin Hydrogel-Degrading Enzymes During Development of Tissue Engineering Scaffolds. *Tiss. Eng.* 2007, 13, (7), 1469-1477.
66. Liang, S.; Xu, J.; Weng, L.; Dai, H.; Zhang, X.; Zhang, L., Protein diffusion in agarose hydrogel in situ measured by improved refractive index method. *J Control Release* 2006, 115, 189-196.
67. Autissier, A.; Letourneur, D.; Le Visage, C., Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res* 2007, 82A, 336-342.
68. Weng, L.; Chen, X.; Chen, W., Rheological Characterization of in Situ crosslinkable Hydrogels Formulated from Oxidized Dextran and Carboxyethyl Chitosan. *Biomacromolecules* 2007, 8, 1109-1115.
69. Dijk-Wolthuis, W. N. E. v.; Franssen, O.; Talsma, H.; Steenbergen, M. J. v.; Bosch, J. J. K.-v. d.; Hennink, W. E., Synthesis, Characterization, and Polymerization of Glycidyl Methacrylate Derivatized Dextran. *Macromolecules* 1995, 28, 6317-6322.
70. Huang, X.; Nayak, B. R.; Lowe, T. L., Synthesis and Characterization of Novel Thermoresponsive-co-Biodegradable Hydrogels Composed of N-isopropylacrylamide, Poly(L-lactic acid), and dextran. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 2004, 42, 5054-5066.
71. Tomme, S. R. V.; Nostrum, C. F. v.; Smedt, S. C. d.; Hennink, W. E., Degradation behaviour of dextran hydrogels composed of positively and negativeley charged microspheres. *Biomaterials* 2006, 27, 4141-4148.
72. Sanabria-DeLong, N.; Agrawal, S. K.; Bhatia, S. R.; Tew, G. N., Controlling hydrogel Properties by Crystallization of Hydrophobic Domains. *Macromolecules* 2006, 39, 1308-1310.
73. Peppas, N. A.; Keys, K. B.; Torres-Lugo, M.; Lowman, A. M., Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. *J. Control Release* 1999, 62, 81-87.
74. Hennink, W. E.; Nostrum, C. F. v., Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002, 54, 13-36.
75. Watanabe, T.; Ohtsuka, A.; Murase, N.; Barth, P.; Gersonde, K., NMR Studies on Water and Polymer Diffusionin Dextran Gels. Influence of Potassium Ions on Microstructure Formation and Gelation Mechanism. *Magn. Reson. Med.* 1996, 35, 697-705.
76. Peppas, N. A.; Benner, R. E., Proposed method of intracordal injection and gelation od poly(vinyl alcohol) solution in vocal cords: polymer considerations. *Biomaterials* 1980, 1, 158-162.
77. Kim, S. J.; Shin, S. R.; Lee, Y. M.; Kim, S. I., Swelling characterizations of chitosan and polyacrylonitrile semi-interpenetrating polymer network hydrogels. *J Appl Polym Sci* 2003, 87, 2011-2015.
78. Gehrke, S. H.; Uhden, L. H.; McBride, J. F., Enhanced loading and activity retention of bioactive proteins in hydrogel delivery systems. *J. Controlled Release* 1998, 55, 21-33.
79. Coviello, T.; Grassi, M.; Rambone, G.; Santucci, E.; Carafa, M.; Murtas, E.; Riccieri, F. M.; Alhaique, F., Novel Hydrogel system from sceroglycan: synthesis and characterization. *J. Controlled Release* 1999, 60, 367-378.
80. Elbert, D. L.; Pratt, A. B.; Lutolf, M. P.; Halstenberg, S.; Hubbell, J. A., Protein delivery from materials formed by self-selective conjugate addition reactions. *J. Controlled Release* 2001, 76, 11-25.
81. Kuijpers, A. J.; van Wachem, P. B.; van Luyn, M. J. A.; Engbers, G. H. M.; Krijgsveld, J.; Zaat, S. A. J.; Dankert, J.; Feijen, J., In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves. *J Control Release* 2000, 67, 323-336.
82. Ichi, T.; Watanabe, J.; Ooya, T.; Yui, N., Controllable Erosion Time and Profile in Poly(ethylene glycol) Hydrogels by Supramolecular Structure of Hydrolyzable Polyrotaxane. *Biomacromolecules* 2001, 2, 204-210.

83. Sperinde, J. J.; Griffith, L. G., Synthesis and Characterization of Enzymatically-Cross-Linked Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Macromolecules* 1997, 30, 5255-5264.
84. Jin, R.; Hiemstra, C.; Zhong, Z.; Feijen, J., Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran-tyramine conjugates. *Biomaterials* 2007, 28, 2791-2800.
85. Beertz, A. Hydrogele auf Basis von mit Phenolen modifizierter Hydroxyethylstärke. Diplomarbeit, 2009.
86. Ortega, A.; Bucio, E.; Burillo, G., Radiation polymerization and crosslinking of (N-isopropylacrylamide) in solution and in solid state. *Polym. Bull.* 2007, 58, 565-573.
87. Thomas Schmidt, J. I. M. K.-F. A., Temperature-Sensitive Hydrogel Pattern by Electron-Beam Lithography. *Macromolecular Materials and Engineering* 2006, 291, (7), 755-761.
88. Wichterle, O.; Lim, D., Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 1960, 185, 117-118.
89. Bettini, R.; Colombo, P.; Peppas, N. A., Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: Transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J Control Release* 1995, 37, 105-111.
90. Çiçek, H.; Tuncel, A., Immobilization of alpha-chymotrypsin in thermally reversible isopropylacrylamide-hydroxyethylmethacrylate copolymer gel. *J Polym. Sci.* 1998, 36, 543-552.
91. Nuttelman, C. R.; Rice, M. A.; Rydholm, A. E.; Salinas, C. N.; Shah, D. N.; Anseth, K. S., Macromolecular monomers for the synthesis of hydrogel niches and their application in cell encapsulation and tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.* 2008, 33, 167-179.
92. Andersson, M. M.; Hatti-Kaul, R., Protein stabilising effect of polyethyleneimine. *J. Biotechnol.* 1999, 72, 21-31.
93. Roberts, J. S.; Bratton, S. L., Colloid Volume Expanders- Problems, Pitfalls and Possibilities. *Drugs* 1998, 55, 621-630.
94. Edman, P.; Ekman, B.; Sjöholm, I., Immobilization of proteins in microspheres of biodegradable polyacryldextran. *J. Pharm. Sci.* 1980, 69, 838-842.
95. Dijk-Wolthuis, W. N. E. v.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; van der Kerk-van Hoof, A.; Hennink, W. E., Reaction of Dextran with Glycidyl Methacrylate: An unexpected Transesterification. *Macromolecules* 1997, 30, 3411-3413.
96. Dijk-Wolthuis, W. N. E. v.; Tsang, S. K. Y.; Kettenes-van den Bosch, W. E. Hennink, J. J., A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer. *Polymer* 1997, 38, 6235-6242.
97. Yoshii, E., Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 37, 517-524.
98. Hennink, W. E.; Talsma, H.; Borchert, J. C. H.; De Smedt, S. C.; Demeester, J., Controlled release of proteins from dextran hydrogels. *J. Control. Release* 1996, 39, 47-55.
99. Franssen, O.; van Ooijen, R. D.; de Boer, D.; Maes, R. A. A.; Herron, J. N.; Hennink, W. E., Enzymatic Degradation of Methacrylated Dextrans. *Macromolecules* 1997, 30, 7408-7413.
100. Cadée, J. A.; De Kerf, M.; De Groot, C. J.; Den Otter, W.; Hennink, W. E., Synthesis, characterization of 2-(methacryloyloxy)ethyl-(di-) -lactate and their application in dextran-based hydrogels. *Polymer* 1999, 40, 6877-6881.
101. Leone, G.; Barbucci, R., Polysaccharide Based Hydrogels for Biomedical Applications. *Hydrogels- Biological Properties and Applications* 2009, Springer, Milan Berlin Heidelberg New York, 25-41.
102. Marcucci, F.; Lefoulon, F., Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Discov. Today* 2004, 9, 219-228.
103. Franssen, O.; Vandervennet, L.; Roders, P.; Hennink, W. E., Degradable dextran hydrogels: Controlled release of a model protein from cylinders and microspheres. *J. Control Release* 1999, 60, 211-2221.
104. Schwoerer, A. Hydroxyethylstärke-Hydroxyethylmethacrylat-Hydrogele als Freisetzungssystem für Proteine. Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig, 2009.

105. Cadée, J. A.; Brouwer, L. A.; Otter, W. d.; Hennink, W. E.; Luyn, M. J. A. v., A comparative biocompatibility study of microspheres based on crosslinked dextran or poly(lactic-co-glycolic)acid after subcutaneous injection in rats. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 56, 600-609.
106. Cadée, J. A.; van Luyn, M. J. A.; Brouwer, L. A.; Plantinga, J. A.; van Wachem, P. B.; de Groot, C. J.; den Otter, W.; Hennink, W. E., In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels. *J. Biomed. Mater. Research* 2000, 50, 397-404.
107. De Groot, C. J.; Van Luyn, M. J. A.; Dijk-Wolthuis, W. N. E. v.; Cadée, J. A.; Plantinga, J. A.; Den Otter, W.; Hennink, W. E., In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts. *Biomaterials* 2001, 22, 1197-1203.
108. Cadée, J. A.; de Groot, C. J.; Jiskoot, W.; Den Otter, W.; Hennink, W. E., Release of recombinant human interleukin-2 from dextran-based hydrogels. *J. Control. Release* 2002, 78, 1-13.
109. Kozek-Langenecker, S. A., Effects of Hydroxyethyl Starch Solutions on Hemostasis. *Anesthesiology* 2005, 103, 654-660.
110. Thevis, M.; Opfermann, G.; Schänzer, W., Detection of the plasma volume expander hydroxyethyl starch in human urine. *J. Chromatogr. B* 2000, 744, 345-350.
111. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L., *Pharmakologie und Toxikologie*. 16 ed.; Thieme: Stuttgart, 2006.
112. Förster, H. *Produktinformation Hydroxyethylstärke*; Fresenius Kabi Deutschland GmbH: 1988.
113. Fitzpatrick, F.; Schagerlöf, H.; Andersson, T.; Richardson, S.; Tjerneld, F.; Wahlhund, K.-G.; Wittgren, B., NMR, Cloud-point Measurements and Enzymatic Depolymerization: Complementary Tools to Investigate Substituents Patterns in modified Celluloses. *Biomacromolecules* 2006, 7, 2909-2917.
114. Augsten, C. Asymmetrische Fluß Feld-Fluß Fraktionierung in Verbindung mit Mehrwinkellichtstreuung – Eine neue bedeutende Methode der Pharmazeutischen Analytik zur Charakterisierung von Makromolekülen und Nanopartikeln. Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Halle, 2008.
115. CIBA, Produktinformation Irgacure 2959. *CIBA Geigy, Basel (CH)*.
116. Bryant, S. J.; Nuttelman, C. R.; Anseth, K. S., Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems an cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2000, 11, 439-457.
117. Kelner, A.; Schacht, E. H., Tailor-made polymers for local drug delivery: release of macromolecular model drugs from biodegradable hydrogels based on poly(ethylene oxide). *J. Control Release* 2005, 101, 13-20.
118. Watkins, A. W.; Anseth, K. S., Investigation of Molecular Transport and Distributions in Poly(ethylene glycol) Hydrogels with Confocal laser Scanning Microscopy. *Macromolecules* 2005, 38, 1326-1334.
119. De Smedt, S. C.; Meyvis, T. K. L.; Demeester, J.; Van Oostveldt, P.; Blonk, J. C. G.; Hennink, W. E., Diffusion of Macromolecules in Dextran Methacrylate Solutions and Gels As Studied by Confocal Scanning Laser Microscopy. *Macromolecules* 1997, 30, 4863-4870.
120. Lin, C.-C.; Metters, A. T., Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2006, 58, 1379-1408.
121. Leach, J. B.; Bivens, K. A.; C. W. Patrick, J.; Schmidt, C. E., Photocrosslinked Hyaluronic Acid Hydrogels: Natural, Biodegradable Tissue Engineering Scaffolds. *Biotech. Bioengin.* 2003, 82, 578-589.
122. Nikolaos A. Peppas, E. W. M., Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks. *Journal of Applied Polymer Science* 1977, 21, (7), 1763-1770.
123. Bray, J. C.; Merrill, E. W., Poly(vinyl alcohol) hydrogels. Formation by electron beam irradiation of aqueous solutions and subsequent crystallization. *Journal of Applied Polymer Science* 1973, 17, (12), 3779-3794.
124. Canal, T.; Peppas, N. A., Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks. *J. Biomed. Mater. Research* 1989, 23, 1183-1193.

125. Kulicke, W. M., Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen. *Hüthing & Wepf Verlag, Basel Heidelberg New York* 1986, 1. Aufl.
126. Rose, C.; Daniels, R., Grundlagen der Rheologie. *PZ Prisma* 1999, 2, 1564-1568.
127. Schramm, G., Einführung in Rheologie und Rheometrie. *Gebrüder HAAKE GmbH, Karlsruhe* 1995.
128. Sherman, P., Industrial Rheology. *Academic Press, London & New York* 1970.
129. Ferry, J. D., Viscoelastic Properties of Polymers. *Wiley Verlag, New York Chichester Brisbane Toronto* 1980, 3rd Ed.
130. Anseth, K. S.; Bowman, C. N.; Brannon-Peppas, L., Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* 1996, 17, 1647-1657.
131. Homeyer, A. v.; Kulicke, W.-M., Rheo-mechanische Untersuchungen der Netzwerkstruktur von Elektrodenkontaktgelen und HPLC-Methode zur bestimmung des Restmonomergehaltes. *Angew. Makromol. Chem.* 1998, 256, 29-37.
132. Liu, T.-Y.; Hu, S.-H.; Liu, T.-Y.; Liu, D.-M.; Chen, S. Y., Magnetic-Sensitive Behaviour of Intelligent Ferrogels for Controlled Release of Drug. *Langmuir* 2006, 22, 5974-5978.
133. Lee, H.; Lee, E.; Kim, D. K.; Jang, N. K.; Jeong, Y. Y.; Jon, S., Antibiofouling Polymer-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Potential Magnetic Resonance Contrast Agents for in Vivo Cancer Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 7383-7389.
134. Ludwig, F.; Heim, E.; Mäuselein, S.; Eberbeck, D.; Schilling, M., Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles with fluxgate magnetometers for the analysis of biological targets. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005, 293, 690-695.
135. Kötitz, R.; Trahns, L.; Koch, H.; Weitschies, W.; in: Baumgartner, C., Deecke, L., Williamson, S.J. (Eds.), Biomagnetism: Fundamental Research and Clinical Applications. *Elsevier Science, Amsterdam* 1995.
136. Berry, C. C.; Curtis, A. S. G., Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003, 36, R198-R206.
137. Heim, E.; Harling, S.; Ludwig, F.; Menzel, H.; Schilling, M., Fluxgate magnetorelaxometry for characterization of hydrogel polymerization kinetics and physical entrapment capacity. *J. Phys.-Condens. Mat.* 2008, 204106.
138. Harling, S.; Heim, E.; Schwoerer, A.; Ludwig, F.; Schilling, M.; Menzel, H., Hydrogel characterisation: Swelling versus fluxgate magnetorelaxometry. *J. Control. Release* 2008, 132, e68-e69.
139. Heim, E. Fluxgate Magnetorelaxometrie magnetischer Nanopartikel in der Bioanalytik. Dissertation, Braunschweig, 2009.
140. Van Dijk-Wolthuis, W. N. E.; Tsang, S. K. Y.; Bosch, J. J. K.-v. d.; Hennink, W. E., A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethylmethacrylated dextran with and without oligolactate spacer. *Polymer* 1997, 38, 6235-6242.
141. Podzimek, S., The Use of GPC Coupled with a Multiangle Laser light Scattering Photometer for the Characterization of polymers. On the Determination of molecular Weight, Size, and Branching. *J. Appl. Polym. Sci.* 1994, 54, 91-103.
142. Staab, H. A., Synthesen mit heterocyclischen Amiden. *Angew. Chem.* 1962, 74, (12).
143. Staab, H. A., Reaktionsfähige Heterocyclische Diamide der Kohlensäure. *Liebigs Ann. Chem.* 1957, 609, 75.
144. Cowie, J. M. G., Chemie und Physik der synthetischen Polymeren. *Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH* 1997, Braunschweig/Wiesbaden.
145. Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J.-J.; Homo, J.-C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P., Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* 1988, 21, 129-228.
146. Bajpai, S. K.; Saxena, S., Enzymatically degradable an pH-Sensitive Hydrogels for Colon-Targeted Oral Drug Delivery. I. Synthesis and Characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, 92, 3830-3643.

147. Barisch, S. Einfluss von Kryoprotektoren auf Hydroxyethylstärke-basierte Hydrogele als Drug Delivery Systeme für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen. Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen, 2009.
148. Van Dijk-Wolthuis, W. N. E.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; van der Kerk-van Hoof, A.; Hennink, W. E., Reaction of Dextran with Glycidyl Methacrylate: An unexpected Transesterification. *Macromolecules* 1997, 30, 3411-3413.
149. Marsano, E.; Gagliardi, S.; Ghioni, F.; Bianchi, E., Behavior of gels based on (hydroxypropyl) cellulose methacrylate. *Polymer* 2000, 41, 7691-7698.
150. Hofmann, S.; Schwoerer, A.; Harling, S.; Bertz, A.; Daniels, R.; Menzel, H.; Bunjes, H. In *Hydrogel Microparticles as Drug Delivery Systems for the Controlled Release of Biomacromolecules*, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., Jena, 2009; Jena, 2009.
151. Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D., *Purification of Laboratory Chemicals*. 4th ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 1996.
152. Ludwig, F.; Mäuselein, S.; Heim, E.; Schilling, M., Magnetrelaxometry of magnetic nanoparticles in magnetically unshielded environment utilizing a differential fluxgate arrangement. *Re. Sc. Instrum.* 2008, 76, 106102.